F1330

studii şi cercetări de biochimie

1

TOMUL 11
1968

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
St. cerc. biochim., tomul 11, nr. 1, p. 1—100, Bucureşti, februarie 1968

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU.

Secretar de redacție:

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 48 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se fac prin CARTIMEX, Căsuța poștală 134—135, București, Republica Socialistă România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie".

ADRESA REDACȚIEI:

București, *Str. Docenților nr. 20*

Raionul 30 Decembrie

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tomul 11 (1968) Nr. 1

SUMAR

Pag.

S. OERIU, V. COJOCARU, Dinamica heteroauxinelor din coleoptilele şi rădăcinile de grîu tratat cu Folcisteină Oeriu „P" 5

N. ST. CHIŞIU, Studiu imunochimic comparativ al IgA din colostru, bilă şi din serul sanguin de iepure 11

V. GHEŢIE, C. MEDEŞAN, Raporturi antigenice între serul sanguin, mucoasa intestinală şi sucul intestinal la şobolan, cu referire specială la apariţia unui antigen nou în sucul intestinal, în urma ligaturării canalului biliar . . 17

I. HIRSCHFELD, A. KOVÁCS, E. GOINA, P. FURDA, V. GEANGALĂU, Metabolismul protidic în intoxicaţia experimentală cu tetraclorură de carbon şi cloroform. I. Includerea metioninei-^{35}S în compartimentele subcelulare ale ficatului de şobolan în intoxicaţia acută 25

I. HIRSCHFELD, A. KOVÁCS, E. GOINA, A. LÁSZLÓ, P. FURDA, Metabolismul protidic în intoxicaţia experimentală cu tetraclorură de carbon şi cloroform. II. Includerea metioninei-^{35}S în compartimentele subcelulare ale ficatului de şobolan în intoxicaţia cronică 33

G. NEAMŢU, C. BODEA, Contribuţii la biosinteza carotinoidelor. I. Biogeneza carotinoidelor din *Astragalus peterfii* Jav. şi *Adonis aestivalis* L. . . . 39

I. NEGOESCU, A. CONSTANTINESCU, A. DIMITRIU, Determinarea cantitativă a compuşilor iodaţi în ţesutul tiroidian (Studiu cu ^{131}I). 49

E. NICOARĂ, T. SALONTAI, C. BODEA, Carotinoidele din fructele de *Solanum lancifolium* şi *Cyphomandra betacea* 57

D. OŞIANU, C. BILAUS, S. CERNEA, C. BODEA, Dinamica ADN şi ARN în diferite faze de vegetaţie la porumbul hibrid 61

H. D. SCHELL, V. GHEŢIE, Utilizarea agarozei legate încrucişat în cromatografia de excludere moleculară 69

C. ŞELARIU, Forme multiple ale izotransaminazei aspartice mitocondriale din ficatul de şobolan 75

NOTE DE LABORATOR

M. ELIAS, Un procedeu îmbunătăţit de developare a izoenzimogramelor amilazice 83

RECENZII 87

VIAŢA ŞTIINŢIFICĂ 99

St. cerc. biochim., tomul 11, nr. 1, p. 1–100, Bucureşti, februarie 1968

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tomul 11 (1968) Nr. 1

CONTENTS

Page

S. OERIU, V. COJOCARU, Dynamics of heteroauxines in coleoptyles and roots of wheat treated with Folcysteine Oeriu "P" 5

N. ST. CHIŞIU, Comparative immunochemical study of rabbit IgA from colostrum, bile and serum 11

V. GHEŢIE, C. MEDEŞAN, Antigenic relationships between serum, intestinal mucosa and intestinal juice of rats, with particular reference to the appearance of a new antigen in the intestinal juice after stringing the biliar duct 17

I. HIRSCHFELD, A. KOVÁCS, E. GOINA, P. FURDA, V. GEANGALĂU, Der Eiweissstoffwechsel bei experimenteller Tetrachlorkohlenstoff- und Chloroformvergiftung. I. Die Einverleibung von ^{35}S-Methionin in die subzellulären Kompartimente der Rattenleber bei akuter Vergiftung. 25

I. HIRSCHFELD, A. KOVÁCS, E. GOINA, A LÁSZLÓ, P. FURDA, Der Eiweissstoffwechsel bei experimenteller Tetrachlorkohlenstoff- und Chloroformvergiftung. II. Die Einverleibung von ^{35}S-Methionin in die subzellulären Kompartimente der Rattenleber bei chronischer Vergiftung 33

G. NEAMŢU, C. BODEA, Contributions à la biosynthèse des carotinoïdes. I. La biosynthèse des carotinoïdes de *Astragalus peterfii* Jav. et *Adonis aestivalis* L. 39

I. NEGOESCU, A. CONSTANTINESCU, A. DIMITRIU, Quantitative determination of iodinated compounds in thyroid tissue (Study with ^{131}I) . . 49

E. NICOARĂ, T. SALONTAI, C. BODEA, Les carotinoïdes des fruits de *Solanum lancifolium* et de *Cyphomandra betacea* 57

D. OŞIANU, C. BILAUS, S. CERNEA, C. BODEA, Die dynamic von DNS und RNS in verschiedenen Pflanzenwuchsstadien beim Hybridmais. 61

H. D. SCHELL, V. GHEŢIE, Die Anwendung von Quervernetzter Agarose in der Gel-Filtration 69

C. ŞELARIU, Multiple forms of mitochondrial aspartic isotransaminase from rat liver 75

LABORATORY NOTE

M. ELIAS, An improved method for the development of the amylase zymograms 83

BOOK REVIEWS 87

MEETINGS 99

St. cerc. biochim., tomul 11, nr. 1, p. 1—100, Bucureşti, februarie 1968

ST. CERC. BIOCHIM., 11, 1, 5–9 (1968)

DINAMICA HETEROAUXINELOR DIN COLEOPTILELE ŞI RĂDĂCINILE DE GRÎU TRATAT CU FOLCISTEINĂ OERIU „P"

S. OERIU şi V. COJOCARU

Rezumat. — Coleoptilele şi rădăcinile grîului „Triumf" supuse acţiunii Folcisteinei Oeriu „P" prezintă, în raport cu martorul tratat cu apă, un conţinut mai ridicat de acid indolilacetic.

Este de ştiut că grupările —SH sînt indispensabile menţinerii normale a echilibrului biochimic general şi funcţional. Cercetările noastre au evidenţiat rolul acestor grupări eliberate în organism de complecşi de Folcisteină Oeriu „P" pentru plante şi Folcisteină Oeriu „A" pentru animale, asupra creşterii şi dezvoltării organismului animal şi vegetal [6], [7], [8], [9].

În lucrarea de faţă ne propunem studiul acţiunii Folcisteinei Oeriu „P" (FOP) asupra heteroauxinelor totale şi fracţionate (factori de creştere la plante) din coleoptilele şi rădăcinile de grîu „Triumf".

MATERIAL ŞI METODE

Tehnica obţinerii organelor vegetale — coleoptile şi rădăcini:

— s-au ţinut în contact boabele de grîu „Triumf" (un an de la recoltă) cu FOP 5 ml conc. 1/60 000 la 100 boabe, timp de două ore, la temperatura camerei (22 ± 1°C);

— s-au transferat apoi, în cutii Petri (S = 78 cm²), pe hîrtie de filtru umectată cu 5 ml FOP în aceeaşi concentraţie; germinarea s-a făcut la întuneric, la temperatura de 22 ± 1°C).

Pentru studiul heteroauxinelor s-au folosit:

— vîrfurile lungi de 3 mm (± 0,5), secţionate din coleoptilele plantelor de 7 zile;

— rădăcinile acestora.

Extracţia produselor vegetale proaspete, triturate cu nisip de cuarţ în metanol (10 ml solvent : 1 g produs vegetal) s-a făcut la lumina roşie, la temperatura de + 5°C.

După 24 ore de repaus la 0°C, extractul a fost filtrat şi evaporat sub vid, pînă la uscare; reziduul astfel obţinut, dizolvat în alcool metilic, a servit la separarea cromatografică pe hîrtie şi la determinarea colorimetrică a heteroauxinelor.

Extracţia rădăcinilor s-a făcut în aceleaşi condiţii; ca solvent s-a folosit cloroform (15 ml : 1 g produs vegetal).

Pentru reacţia de colorare s-a întrebuinţat reactivul Salkovski modificat [10]. Extincţiile s-au citit la spectrofotometrul VSU-Karl Zeiss Jena, la 520 mμ lungime de undă. La stabilirea raportului faţă de martorul constituit din reactivi s-a folosit curba etalon de acid 3—β—indolilacetic (IA).

Separarea cromatografică s-a făcut pe hîrtie de filtru Whatman nr. 1, după tehnica propusă de Nitsch [3], folosindu-se cromatografia unidimensională ascendentă simplă, în loc de cea dublă.

O dată cu determinarea conţinutului în heteroauxine al coleoptilelor şi radăcinilor de grîu „Triumf" s-a urmărit şi variaţia vitezei de creştere a rădăcinilor, variaţia energiei şi a facultăţii germinative a boabelor de grîu tratate cu apă (martor), cu acid indolilacetic (etalon) şi cu FOP (tabelele 1 şi 2).

Energia germinativă şi facultatea germinativă s-au determinat după STAS-ul în vigoare [12], cu menţiunea că boabele au germinat la întuneric, la temperatura de 22 ± 1°C.

REZULTATE

Variaţia vitezei de creştere în lungime a rădăcinii şi a ritmului de germinaţie la boabele de grîu tratate cu FOP 1/60 000 faţă de boabele martore (tratate cu apă,) respectiv cu IA este redată în tabelele 1 şi 2.

Tabela 1

Variaţia alungirii (*L*) în mm a rădăcinii şi a germinaţiei (*G*) la % a grîului „Triumf" (100 boabe) supus acţiunii tratamentului cu FOP şi IA

Timp (ore)		Valori	Boabe de grîu „TRIUMF" tratate cu:				
			Apă (martor)	FOP 1/60 000	IA 5 μg	IA 10 μg	IA 15 μg
24	*L*	M	1,83	2,12	3,00	2,42	2,00
		E±	0,01	0,08	0,21	0,48	0,27
		P		<0,01	<0,01	>0,05	>0,05
48		M	11,65	13,70	15,25	12,78	11,53
		E±	0,90	1,41	0,90	1,30	1,05
		P		>0,05	<0,05	>0,05	>0,05
72		M	18,30	21,50	25,40	21,88	20,16
		E±	1,09	1,30	1,05	1,05	1,00
		P		=0,05	<0,01	<0,05	>0,05
24	*G*	M	2,75	7,25	15,25	7,00	6,25
		E±	0,59	0,90	0,80	1,05	0,58
		P		<0,01	<0,05	<0,05	<0,05
48		M	47,00	51,25	58,50	50,50	51,25
		E±	1,60	1,60	1,44	1,05	1,00
		P		>0,05	<0,01	>0,05	>0,05
72		M	86,25	87,25	97,50	97,00	97,25
		E±	1,90	1,40	0,78	0,48	0.58
		P		>0,05	<0,01	<0,01	<0,01

M = valoarea medie a 400 de determinări

Viteza de alungire a rădăcinii şi ritmul de germinaţie la grîul tratat cu FOP sînt, în primele 24 de ore, mai mari (statistic semnificative) decît cele observate la boabele de grîu tratate cu apă.

Tabela 2

Variația energiei germinative și a facultății germinative în % la boabele de grîu „Triumf" (100 boabe) tratate cu FOP și IA

Grîu „Triumf" tratat cu:	Energia germinativă (%)			Facultatea germinativă (%)		
	M	E±	P	M	E±	P
Apă	86,25	1,91		95,50	0,66	
FOP 5 ml sol. 1/60 000	87,25	1,05	>0,05	96,25	0,58	>0,05
IA 5 μg	97,50	0,48	<0.01	98,00	0,58	>0,05
IA 10 μg	97,00	0,48	<0.01	97,50	0,43	>0,05
IA 15μg	97,25	0,58	<0,01	97,25	0,58	>0,05

M = valoarea medie a 400 de determinări

Tabela 3

Valorile heteroauxinelor totale și fracționate din coleoptilele și rădăcinile grîului „Triumf" tratat cu FOP

Grîu „Triumf" tratat cu	Valori	Conținutul în compuși heteroauxinici totali (în μg/g produs vegetal proaspăt) și fracționați la % față de totalul lor din:				
		Coleoptile de grîu				Rădăcini
		Totali	Fracționați			Totali
			IA	IP	Tr	
Apă	M	56,65	12,50	12,50	75,00	46,55
	E ±	4,52	0,70	0,70	1,41	5,47
FOP 5 ml sol. 1/60 000 (pentru 100 boabe)	M	64,80	60,00	20,00	20,00	48,96
	E ±	1,22	1,41	0,70	0,70	1,35
	P	0,05	<0,001	<0,01	<0,001	>0,05

IA = acid indolilacetic
IP = acid indolilpropionic
Tr = triptofan

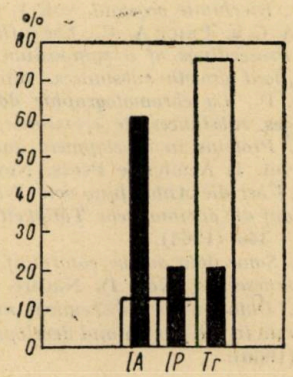


Fig. 1. Dinamica heteroanxinelor fracționate din coleoptilele de grîu, sub acțiunea tratamentului cu Folcisteină Oeriu „P".
IA = acid indolilacetic
IP = acid indolilpropionic
Tr = triptofan
■ = tratat cu Folcisteină Oeriu „P"
□ = netratat

Valorile obţinute sub acţiunea tratamentului cu IA (10 şi 15 μg/100 boabe) sînt, la acest interval de timp, în genere apropiate de cele observate sub acţiunea tratamentului cu FOP (5 ml soluţie 1/60 000 / 100 boabe) şi scăzute faţă de tratamentul cu IA (5 μg/100 boabe). IA apare mult crescut pe seama triptofanului (substanţă de bază a sintezei IA) în coleoptilele grîului tratat cu FOP, faţă de martor (tabela 3 şi fig. 1).

DISCUŢII

Dintre compuşii heteroauxinici, fitohormoni cu structură indolică, izolaţi din plante (acid 3-β- indolilacetic, esterul etilic al acidului indolilacetic, 3-indolilacetaldehida, 3-indolilacetonitril, acidul 3-indolil piruvic, acidul 3-indolilcarboxilic etc.), acidului 3-indolilacetic îi revine stimularea alungirii şi diviziunii celulare, alungirea rădăcinii, mărirea gradului de germinaţie, înfloritul şi dezvoltarea fructelor.

Celorlalţi derivaţi indolici le revine rolul de produşi intermediari în sinteza IA, la al căror punct de plecare se găseşte triptofanul [1].

Creşterea valorii de IA observată la seminţele supuse acţiunii FOP explică alungirea rădăcinilor şi numărul mai mare de boabe germinate în primele 24 de ore la grîul tratat, faţă de martor (boabe tratate cu apă).

Cunoscînd rolul grupărilor —SH asupra activităţii enzimatice [4], [5], ele stimulează probabil sistemele enzimatice cu rol în biosinteza derivaţilor indolici.

Presupunem că Folcisteina Oeriu „P" intervine prin grupările ei —SH puse în libertate şi asupra activităţii auxinoxidazei, inhibînd degradarea pe care auxinoxidaza o produce în ţesuturile vegetale asupra acidului indolilacetic, ipoteză fundată pe observaţia privind acţiunea substanţelor cu grupări tiolice libere (cisteină, glutation) [2], [11].

Primit la redacţie la 30 martie 1967

Colectivul de chimioterapie
Academia Republicii Socialiste România
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Bodea C., *Biochimie vegetală*, vol. 1, Edit. Acad. R.S.R., 1965, p. 640.
2. Leopold A. C. a. Price A. C., *The influence of growth substance upon sulphydril compounds, Proceedings of a symposium (Wye College). The chemistry and mode of action of plant growth substances*, sub red. R. L. Wain şi F. Wightman, 1956, p. 271.
3. Nitsch J. P., *La chromatographie double à une dimension et son emploi à la separation des substances de croissance*, Bull. Soc. Bot. France, **108**, 247 (1960).
4. Oeriu S., *Proteins in development and senescence*, în *Advances in gerontological research*, vol. I, Academic Press, New York and London, 1964, p. 23—85.
5. Oeriu S., *Über die Anhäufung von -S-S- Gruppen bei Alterungsprozessen und deren Wirkung auf die enzimatische Tätigkeit*, Acta Biol. et Med. Germ., Supplementband, 341—346 (1964).
6. Oeriu S., *Some data on the control of -SH enzyme activity in growth development and early senescence (Note I)*, Nature (sub tipar) (1967).
7. Oeriu S., *Data on the biochemical mechanism of the stimulation of metabolic 'processes .A role in the growth and development of plants (Note II)*, St. cerc. biol., **6**, 525—527 (1966).

8. Oeriu S., *Sulphydryl (SH) groups as a stimulating and controlling factor in metabolic processes involved in the growth and development of the plants* (*Note* III), Rev. Roum. Biol. (sub tipar) (1967).
9. Oeriu I., Oeriu S., *Folcysteine Oeriu, a factor promoting growth and development in humans, animals, plants and micro-organismes*, 7-th Intern. Congr. of Gerontology, Viena, Austria, June 26—July 2, Proceedings 159, 143—146 (1966).
10. Pillet Paul-Emil, *Analyse biochromatographique de auxines radiculaires. Technique et resultats*, Rev. Gen. T., **65**, 605—634 (1958).
11. Pillet Paul-Emil, *Les phytohormones des croissances*, Masson, Paris, 1961, p. 492.
12. S T A S Nr. 1634 (1960), *Semințe agricole pentru însămînțare; determinarea germinației, a puterii de străbatere și a viabilității* (Biblioteca Inst. Agronomic N. Bălcescu Buc.).

DYNAMICS OF HETEROAUXINES IN COLEOPTYLES AND ROOTS OF WHEAT TREATED WITH FOLCYSTEINE OERIU "P"

SUMMARY

Indolyl-acetic acid in coleoptyles and roots of wheat "Triumph" subjected to the action of Folcysteine Oeriu "P" is found in greater amounts than in those treated with water.

ST. CERC. BIOCHIM., 11, .1 X. 11–16 (1968)

STUDIU IMUNOCHIMIC COMPARATIV AL IgA DIN COLOSTRU, BILĂ ŞI DIN SERUL SANGUIN DE IEPURE

N. ST. CHIŞIU

Rezumat. — Prin metode imunochimice se cercetează comparativ IgA din colostrul, bila veziculară şi serul sanguin de iepure. Se constată că IgA au o structură antigenică comună, fie că provin din ser, din bilă sau din colostru, fiind deci expresia fenotipică a aceleiaşi informaţii genetice.

Raportul cantitativ al acestor imunoglobuline este foarte diferit în ser, colostru şi bilă. Ele sînt relativ bogate şi preponderente faţă de IgG în bilă, apar la valori echivalente cu IgG în colostru şi sînt foarte sărac reprezentate în serul sanguin.

Pe aceste criterii se discută circuitul lor fiziologic.

Imunoglobulinele de tip IgA au fost identificate în serul sanguin de iepure [15], [16], în colostru [10] şi în bila veziculară [5] la această specie. Studii imunochimice, în special ale IgA colostrale, au arătat că aceste imunoglobuline de iepure prezintă caracteristici similare cu omoloagele lor de la om în raport cu IgG : mobilitate electroforetică mai mare, lanţul L comun etc. [3], [17]. Ca loc de sinteză pentru IgA—globulinele de iepure au fost indicate celulele limfoide de la nivelul mucoasei intestinale (Crandall şi Cebra, citaţi de [3]), situaţie similară cu cea descrisă anterior la om [9]. De altă parte, glanda mamară încorporează, *in vitro*, acizi aminaţi marcaţi în IgA [14], ceea ce arată că şi la iepure aceste imunoglobuline din colostru ar putea fi rezultatul unei sinteze locale. Raportul cantitativ între IgA şi IgG din serul sanguin, din bila veziculară şi din colostrul de iepure, evidenţiat imunoelectroforetic în prezentul studiu, favorizează ipoteza potrivit căreia IgA—globulinele ar putea fi sintetizate atît în glanda mamară cît şi în epiteliul biliar.

MATERIAL ŞI METODE

S-au analizat prin imunoelectroforeză simplă sau imunoelectroforeză comparativă (7) probe de ser sanguin proaspăt recoltat sau după păstrare la +4°C timp de 6—8—10 luni, probe de bilă veziculară recoltată prin puncţia veziculei, după sacrificarea iepurelui, şi probe de colostru şi lapte, obţinute prin recoltări succesive de la două iepuroaice, ambele imunizate în prealabil.

Electroforeza a fost făcută pe gel de agaroză — soluţie 1% în tampon veronal — veronal sodic pH 8,6, forţă ionică 0,025 (în cuvele electrozilor — 0,05), sub un curent de 1,8 mA

per cm lamă, timp de 1—2 ore. S-a folosit un aparat de electroforeză cu răcire prin curent continuu de apă de la robinet.

Pentru precipitarea selectivă a componentelor căutate au fost preparate, după tehnici descrise anterior [4], [5], [6], seruri imune corespunzătoare : (*a*) ser imun anti ser sanguin de iepure, preparat pe capră [1] ; *b*) seruri imune anti bilă veziculară de iepure, preparate pe porumbel și *c*) seruri imune anti lanț L și anti lanț H[2] preparate tot pe porumbei. Atît serul sanguin cît și bila veziculară și colostrul s-au cercetat în starea și concentrația lor naturală, cum erau la recoltare; colostrul a fost doar degresat prin centrifugare.

REZULTATE

A. În colostrul de iepuroaică, IgA și IgG sînt prezentate în concentrații importante. Apreciind după aspectul arcului de precipitare obținut electroforetic în difuziune față de un ser imun anti lanț L (fig.1*a*,*c* și *d*), se poate deduce că cele două imunoglobuline sînt prezente, în colostrul din prima zi, în concentrații echivalente. Evident că această echivalență se raportează aici la ceea ce reflectă participarea lanțurilor L în constituția moleculară a celor două proteine — lanțuri care apar atît în IgA cît și în IgG — avînd aceeași structură antigenică. Că bucla anodică a arcului de precipitare reprezintă de fapt molecula de IgA, și nu fragmente liberate din IgG, cum a fost demonstrat de către unii autori în serul uman vechi [18],[19],[20], o arată imaginile obținute cu ser imun antibilă, care conține anticorpi și față de lanțurile grele ale celor două tipuri de molecule, respectiv anti-*alfa* și anti-*gamma*, cum se distinge în figura 1 *a* și 1 *c* (partea stîngă). Se vede aici că la joncțiunea celor două bucle ale arcului de precipitare — comun pentru IgA și IgG — există cîte un pinten de continuitate pentru fiecare buclă, fiecare pinten semnalînd prezența lanțului greu corespunzător, distinct pentru cele două tipuri de imunoglobuline. Această diferențiere antigenică și, respectiv, identificare a celor două imunoglobuline apare mai netă cînd imunoelectroforeza colostrului este făcută contra unor seruri imune în care domină anticorpii pentru una sau alta. Serul imun aplicat în șanțul din stînga (fig. 1 *b*) precipită comparativ mai intens arcul corespunzător la IgA, conținînd — probabil — un titru mai ridicat de anticorpi anti lanț *alfa*. Dimpotrivă, serul imun anti lanț *gamma* (antigenul H era contaminat cu urme de L) precipită predominant bucla corespunzătoare imunoglobulinei IgG (în dreapta la fig 1 *d*).

Serul imun de capră anti ser de iepure relevă în colostru atît molecule IgG cît și molecule IgA. Aspectul și raportul reciproc ale arcurilor de precipitare corespunzătoare (la IgG și IgA) prezintă unele caractere diferențiale față de cele descrise mai sus (vezi fig. 1*e* dreapta) ; aceste aspecte vor fi cercetate ulterior.

Diferențierea celor două tipuri de imunoglobuline — IgA și IgG — din colostrul de iepuroaică a putut fi făcută și pe criteriul particularităților funcționale : în colostrul de iepuroaică imunizată, în al cărei ser se găseau anticorpi de tip IgG, tot numai moleculele IgG, nu și cele de IgA, aveau caracterul de anticorpi . Așadar, în colostru, ca și în serul sanguin

[1] De către dr. A. Olinescu, de la Inst. Dr. I. Cantacuzino, București.

[2] Preparate din IgG-iepure de către Silvia Mihăescu, de la Inst. de Biochimie al Academiei Republicii Socialiste România.

(la acest caz), numai unul dintre cele două tipuri de imunoglobuline (aici IgG) era purtător de anticorpi.

În afară de proteinele descrise, cu unele seruri imune se mai pun în evidenţă încă două arcuri de precipitare, corespunzătoare — probabil — unul serum albuminei şi altul transferinei [17]. Raportîndu-ne la topografia acestora, precizăm aici că faţă de primele date privind poziţia electroforetică relativă a IgA, descrise în zona $beta_2$—globulinelor [10], noi am găsit arcul de precipitare corespunzător etalat în zonele $alfa_2$-$beta_1$ -globulinelor, cu vîrful de curbură situat între $alfa_2$ şi $beta_1$ (electroforeză în agaroză).

B. În bila veziculară de iepure, imunoglobulina de tip IgA pare să fie componenta proteică, comună cu serul sanguin, cea mai bine reprezentată cantitativ. În afară de această caracteristică a IgA, în raport cu IgG, prima este constant prezentă în concentraţii relativ mari în bilă, iar cea de-a doua poate uneori să lipsească, alte ori fiind prezentă numai în cantităţi mici în comparaţie cu IgA. Aceste date sînt ilustrate în figura 2 *a* şi *b*.

Identificarea IgA din bilă se face în comparaţie cu electroforeza paralelă a lanţului L (fig. 2 *a*, cele două godeuri din stînga şi, respectiv, şanţul din stînga) şi prin precipitare directă a electroforezei bilei de iepure, pe de o parte (dreapta) cu ser anti lanţ L, iar pe de alta cu ser anti bilă (stînga, fig. 2 *b*).

Arcul de precipitare corespunzător la IgG se identifică printr-o metodă combinată de imunoelectroforeză cu dublă difuziune [8] (şi după Chişiu, citat de [12]), ca în figura 2 *a*, unde, după electroforeză — în godeul median jos — s-a aplicat, ca antigen, lanţ H din IgG, obţinîndu-se joncţiunea liniei de precipitare respective cu cea corespunzătoare la IgG din bilă. Poziţia electroforetică a acestei proteine este mult modificată în bilă faţă de omoloaga sa din serul sanguin, cum se poate vedea tot în figura 2 *a*, în partea dreaptă fiind migrat, în paralel, ser sanguin de iepure, precipitat pe de o parte cu acelaşi ser anti bilă (stînga), iar pe de altă parte cu ser imun anti ser sanguin (dreapta).

C. Cercetarea comparativă a bilei veziculare, faţă de colostru, confirmă datele de mai sus, în sensul că în unele mostre de bilă IgG poate lipsi — ca în cele redate în figura 3 *a* şi *b*—, în altele fiind prezentă în concentraţie relativ mică şi avînd o poziţie electroforetică modificată (fig.3 *c*).

Se remarcă însă, de fiecare dată, că IgA sînt foarte bine reprezentate cantitativ în bilă, fapt ce ne face să reţinem această secreţie naturală ca o sursă importantă de materie primă pentru prepararea de IgA de iepure şi, respectiv, a determinanţilor antigenici specifici lanţului propriu acestei proteine, cu scopul de a produce apoi anticorpi necesari cercetărilor imunochimice, fiziologice, de genetică moleculară şi altele.

D. După cum au semnalat şi alţi autori [15],[16], IgA sînt prezente şi în serul sanguin la iepure, dar în alte concentraţii, absolute şi relative, decît la om sau la alte specii [22],[13],[1],[2],[3]. Utilizînd serurile imune anti bilă de iepure, bogate în anticorpi anti IgA, am identificat prezenţa acestei proteine în serul sanguin de iepure normal sau hiperimunizat, în

concentrații variabile însă. În sensul scăderii, variabilitatea aceasta poate merge pînă la o reprezentare atît de slabă a IgA în ser încît nici n-au putut fi puse în evidență imunoelectroforetic, cum se și ilustrează în figura 4 *a*.

În serurile sanguine recoltate de la iepuri hiperimunizați arcul de precipitare corespunzător la IgA este relativ bine exprimat. Nu se observă diferențe semnificative în privința raporturilor dintre IgG și IgA, între serurile hiperimune proaspăt recoltate și cele păstrate lungă vreme la frigider. Facem această precizare pentru a distinge aceste date de cele referitoare la eventualele scindări *in vivo* ale altor imunoglobuline [16], [17], [18], cu liberarea de fragmente Fab și Fc care ar putea da, imunoelectroforetic, imagini similare (cu excepția pintenului catodic al arcului de precipitare reprezentînd IgA—lanț alfa și care încrucișează extremitatea anodică a arcului de precipitare corespunzător la IgG).

Deși între hiperimunizare și prezența sporită a IgA în ser la iepure ar exista o relație de dependență, cum o subliniază și alte cercetări [15], [16], în mostrele cercetate de noi anticorpii precipitanți erau situați exclusiv în zona IgG, și aceasta atît în serul sanguin cît și în colostru, la același caz. Nu am cercetat însă, sub acest aspect, ser și colostru de la iepuri hiperimunizați, la care serul sanguin conținea anticorpi precipitanți, situați electroforetic și în alte zone decît cea corespunzătoare la IgG, cum am avut cazuri în hiperimunizări de lungă durată, cu bilă veziculară și hepatică umană [4]. În baza analizelor făcute, apreciem însă că și în astfel de împrejurări concentrația IgA-globulinelor rămîne mult inferioară în ser față de colostru, și inferioară încă față de bila veziculară.

DISCUȚII

Deși estimarea cantitativă a IgA prin imunoprecipitare electroforetică este relativă, totuși metoda permite apecieri comparative, dacă este aplicată în aceleași condiții și, în paralel, la colostru, bilă și ser sanguin. Cu aceste rezerve, datele noastre arată că IgA sînt prezente la iepure în cantități importante în bila veziculară, ca secreție permanentă, apoi sînt reprezentate, la valoare echivalentă cu IgG, în colostru, secreție ocazionată de maternitate, în timp ce în serul sanguin ele reprezintă un procentaj redus față de IgG. Raportul cantitativ al IgA și IgG din ser este puțin modificat chiar și în condiții de hiperimunizare, cînd IgA sînt prezente în cantități ușor dozabile, fără ca ele însele să fie purtătoare de anticorpi precipitanți, ca în cazul citat în acest studiu. Diferențele în concentrația relativă a IgA și IgG în serul sanguin, în raport cu colostrul și cu bila, suscită discuții cu privire la locurile de sinteză ale acestor proteine. Unele cercetări au indicat chiar glanda mamară [14], iar altele peretele intestinal [9], ganglionii limfatici și splina [2] la om, la care însă aceste imunoglobuline au o importantă reprezentare în serul sanguin [2].

La iepure însă, IgA sînt foarte slab reprezentate în serul sanguin. Pe de altă parte, secreția colostrală reprezintă o perioadă fiziologică scurtă și, evident, la mascul total absentă. Faptul consemnat de noi privitor la prezența IgA în bilă [5], confruntat și verificat aici în studii comparative, atrage atenția asupra intervenției funcționale posibile a aparatului biliar în circuitul acestor proteine. Această intervenție apare foarte importantă,

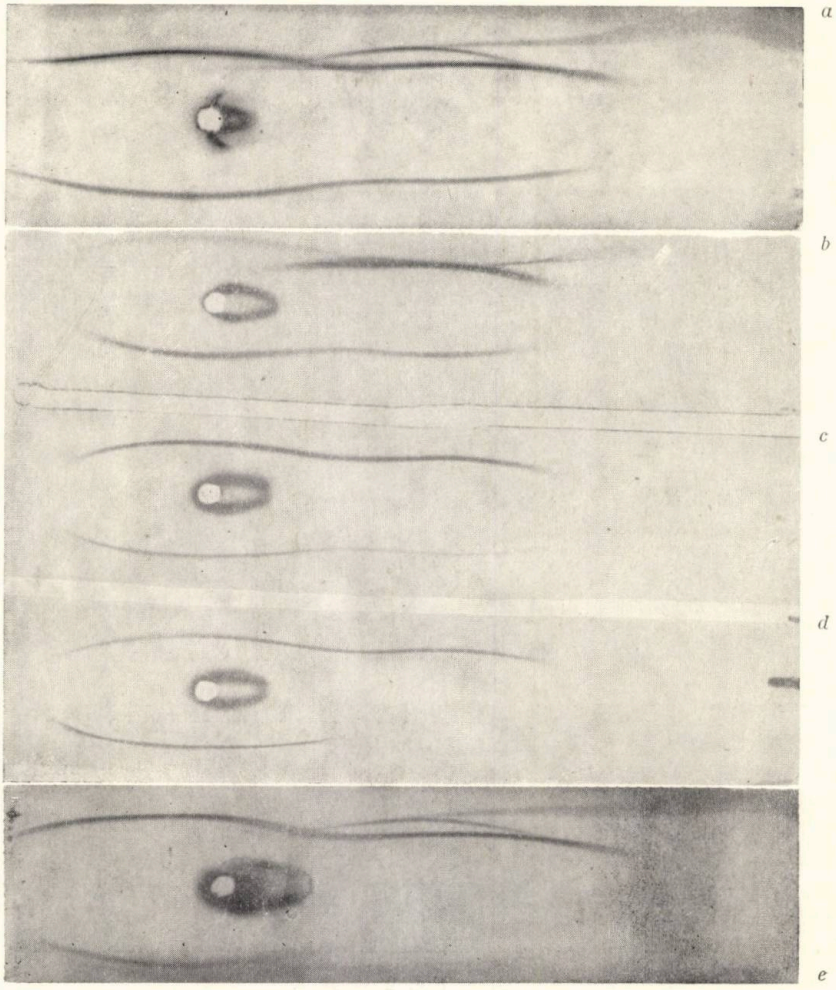
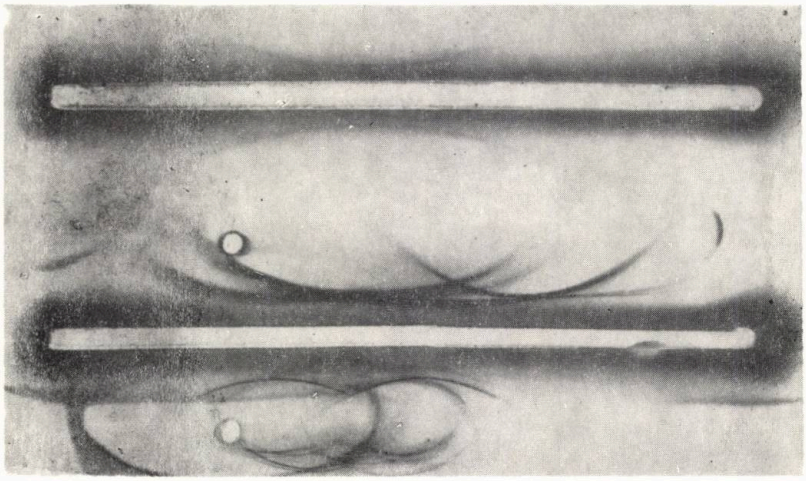
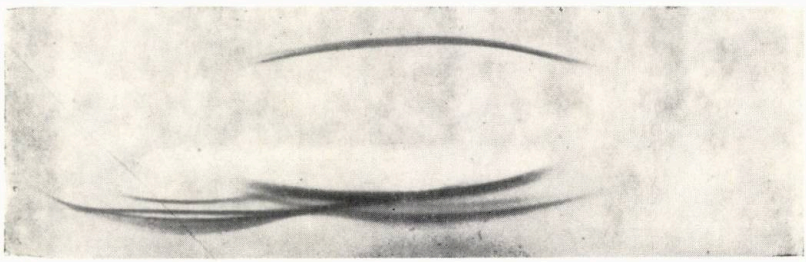


Fig. 1

a





b

Fig. 2

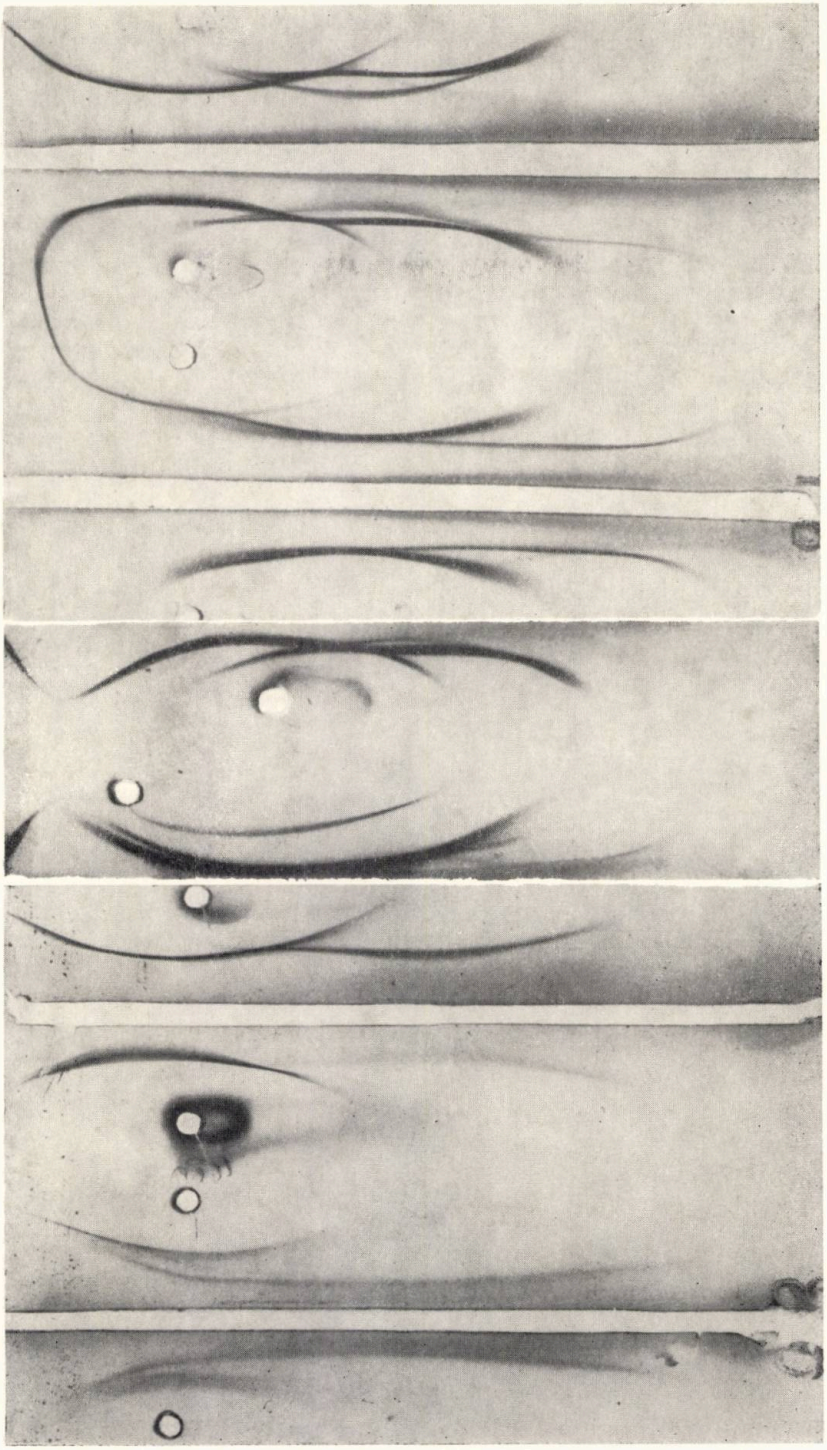


Fig. 3

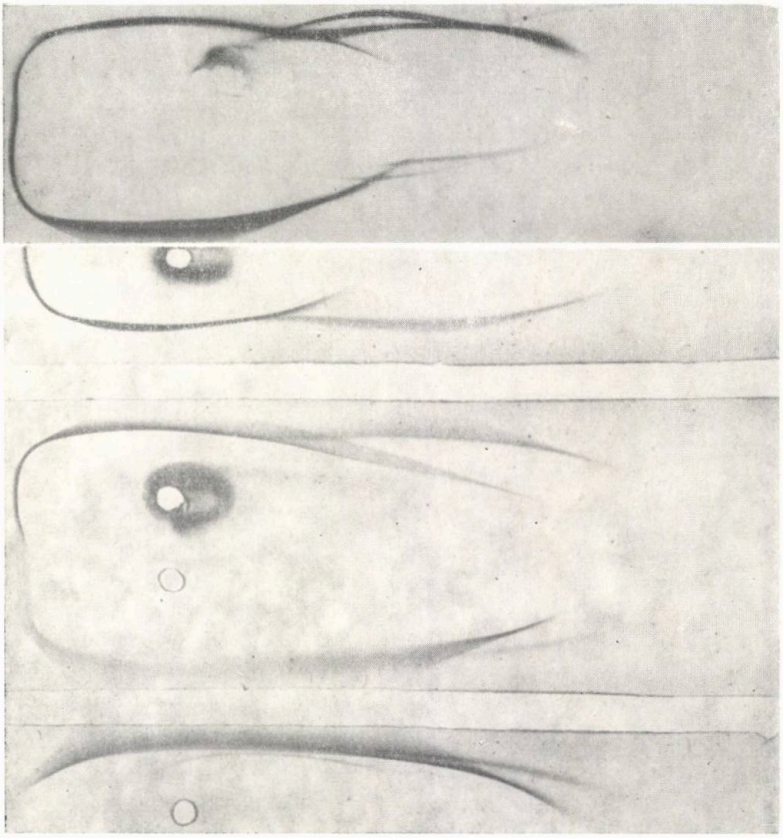


Fig. 4

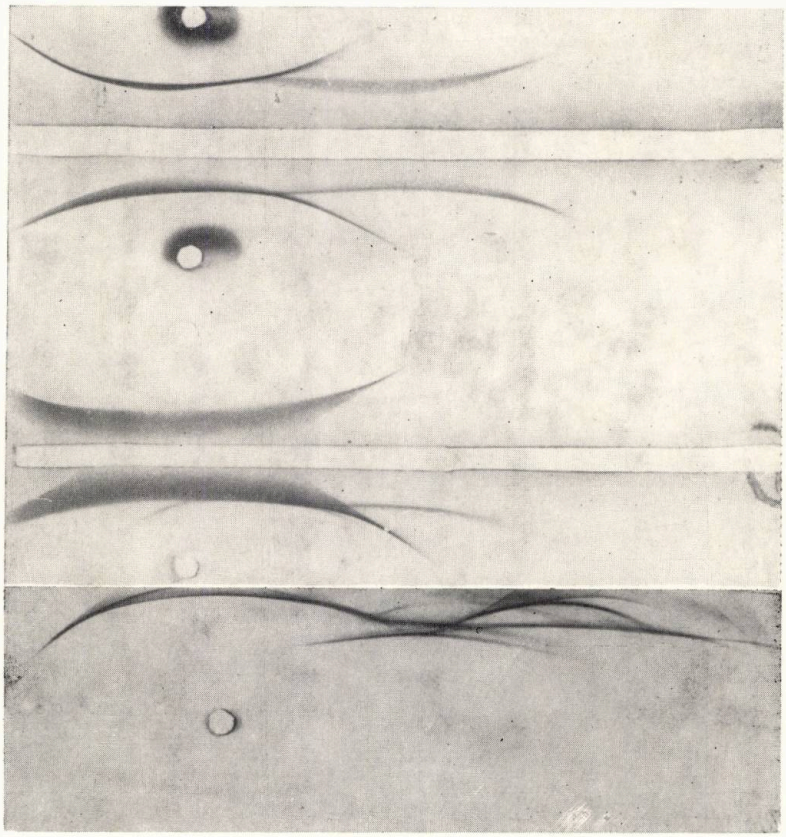


Fig. 4

dacă avem în vedere faptul că secreţia biliară este permanentă şi de volum apreciabil. De altă parte, ţinînd seama de excreţia acestor proteine direct în duoden, datele privitoare la prezenţa preponderentă a IgA la nivelul mucoasei intestinale ar putea apare într-o lumină nouă.

În privinţa structurii antigenice a moleculei de IgA, unele din diagramele imunoelectroforetice obţinute de noi în colostru sugerează existenţa de determinanţi comuni la cele două clase de imunoglobuline (IgA, IgG), inclusiv la nivelul lanţurilor grele, în concordanţă de altfel şi cu observaţii făcute de alţi autori [11],[21],[3],[17], [15], [16]. Se pare că aceste aspecte de înrudire antigenică sînt încă mai complicate în bilă [5], şi pentru lămurirea lor vor fi necesare studii ulterioare.

CONCLUZII

1. IgA sînt prezente în colostru, în bila veziculară şi în serul sanguin de iepure.
2. În colostrul din prima zi, IgA apar în concentraţie echivalentă cu IgG.
3. În bila veziculară, IgA reprezintă proteina cu concentraţia relativă cea mai ridicată.
4. Bila constituie sursa cea mai bogată pentru această clasă de imunoglobuline (IgG pot lipsi uneori din bilă).
5. IgA din ser, colostru şi bilă au structuri antigenice comune.
6. Este posibil ca în colostru şi în bila veziculară de iepure să existe o globulină diferită de IgG şi IgM, cu mobilitate electroforetică distinctă, avînd însă determinanţi antigenici comuni cu IgA.

Prezentat la redacţie la 28 iunie 1967

Laboratorul experimental
Spitalul „Dr. I. Cantacuzino”,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Bernier G. M., Cebra J. J., J. Immunol., *95*, 246 (1965).
2. Cebra J. J., Colberg J. E., Dray S., J. exp. Med., *123*, 547 (1966).
3. Cebra J. J., Robbins J. B., J. Immunol., *97*, 12 (1966).
4. Chişiu St. N., Rev. roum. biochim., *3*, 207 (1966).
5. Chişiu St. N., Rev. roum. med. int., nr. 4, 1967 (în curs de apariţie).
6. Chişiu St. N., St. cerc. med. int., nr. 4, 1967 (în curs de apariţie).
7. Chişiu St. N., Rev. roum. biochim., nr. 4, 1967 (în curs de apariţie).
8. Chişiu St. N., Cincă D., Immun. Otolaringol., Paris, *83*, 741 (1966).
9. Crabbé P. A., Carbonara A. O., Heremans J. J., Lab. Invest., *14*, 235 (1965).
10. Feinstein A., Nature (Lond.), *199*, 1197 (1963).
11. Feinstein A., Gell P. G. H., Kelus A. S., Nature (Lond.), *200*, 653 (1963).
12. Gheţie V., Micuşan V., *Analiza imunochimică*, Edit. Acad. R. S. România, Bucureşti, 1966.
13. Hermans J. F., *Les globulines sériques du système gamma*, Masson, Paris et Editions Arscia, Bruxelles, 1960.
14. Hochwald G. M., Jacobson E. B., Thorbecke G. J., Fed. Proc., *23*, 557 (1964).
15. Onoue K., Yagi Y., Pressman D., J. Immunol., *92*, 173 (1964).
16. Onoue K., Yagi Y., Pressman D., J. exp. Med., *123*, 173 (1966).
17. Sell S., Immunochemistry, *4*, 49 (1967).

18. SKVARIL F., Folia Microbiol. (Prague), *5*, 264 (1960).
19. SKVARIL F., Nature (Lond.), *185*, 475 (1960).
20. SKVARIL F., Clin. Chim. Acta, *15*, 544 (1967).
21. STEMKE G. S., Science, *145*, 403 (1964).
22. TOMASI T. B., JR., TAN E. M., SOLOMON A., PENDERGAST R. A., J. exp. Med., *121*, 101 (1965).

COMPARATIVE IMMUNOCHEMICAL STUDY OF RABBIT IgA FROM COLOSTRUM, BILE AND SERUM

SUMMARY

By immunochemical methods, colostrum, gall-bladder bile and serum are compared. It is found that IgA have a common antigenic structure either they result from serum or from bile or colostrum, being then the phenotypic expression of the same genetic information.

The quantitative ratio of these immunoglobulins in serum, colostrum and bile is very different. They are relatively rich and preponderant toward IgG in bile, in equivalent amounts with IgG in colostrum and are very poorly represented in the serum.

Based on these criteria their physiological turnover is discussed.

ST. CERC. BIOCHIM., **11**, *1*, 17–23 (1968)

RAPORTURI ANTIGENICE ÎNTRE SERUL SANGUIN, MUCOASA INTESTINALĂ ŞI SUCUL INTESTINAL LA ŞOBOLAN, CU REFERIRE SPECIALĂ LA APARIŢIA UNUI ANTIGEN NOU ÎN SUCUL INTESTINAL, ÎN URMA LIGATURĂRII CANALULUI BILIAR

VICTOR GHEŢIE şi CORNELIU MEDEŞAN

Rezumat. — S-a arătat că în mucoasa intestinală a şobolanilor, alături de antigene specifice există şi antigene de origine plasmatică, dintre care γA-globulinele sînt cu deosebire bine reprezentate.

În sucul intestinal există numeroase antigene care provin din mucoasa intestinală, alături de un număr de antigene prezente şi în serul sanguin şi ajunse în lumen fie prin traversarea mucoasei intestinale, fie pe cale biliară.

În sucul intestinal al animalelor cu canalul biliar ligaturat s-a evidenţiat un antigen nou, cu o mobilitate electroforetică cuprinsă între aceea a α_1- şi α_2-globulinelor. Se discută cauzele care pot determina apariţia antigenului şi implicaţiile sale în procesele imunopatologice de la nivelul intestinului.

Proteinele existente în sucul intestinal uman pot fi împărţite în două categorii : componente specifice intestinului şi proteine plasmatice [1]. Din prima categorie fac parte, în special, enzimele digestive, dar şi materiale antigenice care provin din epiteliul mucoasei, iar în a doua categorie se includ proteinele plasmatice care pot ajunge la acest nivel trecînd din spaţiul interstiţial, peste bariera celulară ridicată de mucoasa intestinală [1]. Cercetările noastre anterioare au arătat că, la şobolan, mucoasa intestinală joacă un rol important în reţinerea şi degradarea antigenelor ajunse aici pe cale circulatorie [2],[3]. Din aceste date am desprins concluzia generală că mucoasa intestinală poate fi implicată direct în catabolizarea proteinelor autologe şi eterologe. Deci, după părerea noastră, la cercetarea raporturilor antigenice dintre proteinele plasmatice şi cele din sucul intestinal trebuie introdus un element nou de referinţă, şi anume proteinele din mucoasa intestinală.

Datorită poziţiei cheie pe care mucoasa intestinală o are în interrelaţia dintre proteinele din sînge şi cele din sucul intestinal, noi ne-am propus să stabilim în această lucrare raporturile antigenice în succesiunea : ser sanguin→mucoasă intestinală→suc intestinal. Am utilizat în acest scop mai ales serul imun antimucoasă intestinală de şobolan. Acest antiser este capabil să semnaleze variaţii atît la nivelul proteinelor specifice sucului intestinal, care se sintetizează în bună parte în mucoasă, cît şi la nivelul proteinelor plasmatice care se găsesc în mucoasă ca atare sau în forme antigenice

modificate conform gradului lor de catabolizare. În sucul intestinal ne-am propus să facem distincţie între antigenele proprii şi cele aduse aici de bilă, ştiind că prin intermediul acesteia pot ajunge în suc destule proteine plasmatice, alături de cele proprii bilei [4]. De aceea, am comparat imunoelectroforetic sucul intestinal prelevat de la şobolani normali, cu cel de la animale cu canalul biliar ligaturat.

MATERIAL ŞI METODE

1. *Perfuzia intestinului şi prepararea extractelor din mucoasa intestinală.* Intestinul subţire s-a perfuzat după o variantă a tehnicii lui Cohen [5], descrisă într-o lucrare anterioară [2]. După o perfuzie de 45 min intestinul s-a decolorat, iar în perfuzat nu s-au mai detectat imunochimic proteinele din serul de şobolan. Intestinul subţire a fost tăiat de la flexura duodeno-jejunală la joncţiunea ileo-cecală şi s-a disociat cu grijă de mezenter. S-a îndepărtat conţinutul intestinal, s-a spălat lumenul de cîteva ori cu soluţie Tyrode şi apoi s-a întors intestinul în deget de mănuşă. S-a ras mucoasa intestinală cu o lamă de oţel pe o placă de sticlă răcită, iar materialul s-a omogenizat la rece, 20 min, într-un aparat Potter cu piston de material plastic. S-a folosit un raport de 1 parte mucoasă/3—5 părţi soluţie de NaCl 0,145 M, tamponată la pH 7,0 cu fosfat 0,02 M. Omogenatul s-a centrifugat la rece, la 20 000 g, timp de 60 min. Supernatantul limpede a fost utilizat ca antigen în analiza imunoelectroforetică.

2. *Recoltarea bilei.* S-au anesteziat şobolani cu uretan (0,4 ml/100 g greutate corporală, dintr-o soluţie 20% administrată subcutan). Pentru a realiza o anestezie completă, s-a dat animalelor să inhaleze din cînd în cînd amestec de eter şi aer.

Pentru abordarea canalului biliar, s-a practicat o incizie mediană a pielii şi muşchilor în regiunea abdominală, în lungime de 3 cm. S-a evidenţiat duodenul şi s-a ligaturat canalul la o distanţă cu circa 2 cm mai sus de locul de vărsare în intestin. În continuare, s-a ciupit canalul cu vîrful foarfecii, mai sus de ligatură, şi s-a introdus un tub de polietilenă cu un diametru de 1 mm. S-a legat tubul de canal; s-a pensat pielea şi muşchii în jurul tubului pentru a evita deshidratarea regiunii. Capătul liber al cateterului a fost introdus într-o eprubetă de hemoliză în care bila a curs continuu. Durata colectării a fost de 2—3 ore, iar cantitatea de aproximativ 2 ml.

3. *Ligaturarea canalului biliar şi recoltarea sucului intestinal.* Anestezia şi abordarea canalului biliar la şobolan s-au efectuat după tehnica descrisă mai sus, luîndu-se precauţia ca intervenţia să se facă aseptic. S-a practicat ligaturarea coledocului, apoi s-au cusut muşchii abdominali şi tegumentul. După 24 de ore, interval în care animalelor li s-a asigurat hidratarea prin gavare, acestea au fost sacrificate prin decapitare. S-a deschis cavitatea abdominală, s-au practicat două ligaturi ale intestinului subţire, prima la 1 cm mai jos de locul de vărsare a canalului biliar, iar a doua la nivelul porţiunii mediane a ileonului. S-a excizat intestinul în afara ligaturilor şi s-a degajat de mezenter. S-a spălat intestinul la exterior, de cîteva ori, cu soluţie Tyrode rece (+5°C), pentru a îndepărta sîngele şi a fost şters apoi cu vată. În capetele distale s-a introdus cîte o canulă de sticlă cu diametrul de 3 mm, s-au ligaturat la intestin şi apoi, cu ajutorul unei seringi, s-au introdus 3 ml soluţie Tyrode rece, împreună cu aer, pentru a antrena conţinutul intestinal, care s-a colectat. În cîteva experienţe, în scopul de a inhiba tripsina, animalele s-au gavat cu 2 ml soluţie de tripsin inhibitor (Biofarm, 2500 u.T.k/2ml) diluat 1 :1 cu apă distilată, atît înainte de operaţia de ligaturare a canalului biliar, cît şi cu 2 ore înainte de recoltarea sucului intestinal. De asemenea, în aceste cazuri, recoltarea sucului intestinal s-a făcut cu soluţie de tripsin-inhibitor, diluată 1 :10 cu soluţie Tyrode.

4. *Obținerea serului de iepure antimucoasă intestinală.* S-a recoltat și prelucrat mucoasa intestinală în modul descris mai sus, fără însă a utiliza intestine perfuzate. Omogenatele nu s-au mai centrifugat, ci s-au administrat ca atare iepurilor, în asociație cu adjuvant Freund sau hidroxid de aluminiu și antibiotice (streptomicină și penicilină). S-au făcut 6-8 inoculări repetate la interval de o săptămînă, fiecare injecție conținînd echivalentul a 30 mg mucoasă intestinală uscată. S-au făcut sîngerări repetate și s-a selecționat serul cu spectrul de reacție cel mai larg.

5. *Analiza prin imunodifuzie.* Condițiile de lucru pentru dubla difuzie și analiza imunoelectroforetică au fost descrise în lucrări anterioare [2], [3]. Pentru evidențierea și identificarea antigenelor comune și a celor specifice s-au utilizat tehnicile complimentare descrise de Osserman [6] și N. St. Chișiu [7]. Albumina serică de șobolan a fost obținută prin precipitare cu etanol acidificat, după tehnica lui S. Michael [8], iar γG-globulina a fost izolată prin precipitare cu sulfat de amoniu 40% și purificare prin cromatografie pe DEAE-celuloză [9], utilizînd tamponul fosfat, pH 8,0, 0,02 M (se eluează 18% din proteina introdusă).

Serurile de iepure antișobolan au fost obținute prin injectarea repetată a animalelor cu ser de șobolan, în asociație cu adjuvant Freund complet.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

A. Raporturi antigenice între serul sanguin de șobolan și extractul de mucoasă intestinală

Analiza imunoelectroforetică comparativă a mozaicului de antigene din ser și mucoasă este redată în figura 1. Din examinarea diagramelor se pot trage următoarele concluzii :

1. În mucoasa intestinală (perfuzată) rămîn prezente antigene de origine plasmatică. Deoarece ele se găsesc în mucoasa intestinală perfuzată, trebuie admisă prezența lor în interiorul celulelor, și nu în spațiul extracelular, de unde perfuzia le poate îndepărta. Dintre proteinele plasmatice prezente în mucoasă, atrage atenția cantitatea însemnată de γA-globulină (fig. 1 *c*), fapt în acord cu rezultatele lui. Crabbé și colab. [10]. Aceștia constată că la nivelul intestinului subțire de om celulele plasmatice care sintetizează γA-globulina sînt de 10 ori mai numeroase decît cele de tip γG. În extractele de mucoasă intestinală perfuzată n-am reușit să identificăm imunoelectroforetic γG-globulina. În figura 1 *a* se observă că linia pentru γG este dată numai de serul sanguin. Linia de precipitare etalată între godeul cu mucoasă și șanț însemnată cu o săgeată este dată de γG-globulina din godeul cu ser sanguin. Această interpretare este susținută atît de poziția asimetrică, caracteristică, a liniei de precipitare [7], cît și de faptul că în figura 1 *c* se observă clar absența liniei γG la reacția omologă, mucoasă-ser antimucoasă.

Faptul că în serul antimucoasă sînt prezenți anticorpi anti γG nu arată cîtuși de puțin că acest antigen este prezent în mucoasa perfuzată, deoarece pentru imunizare s-au folosit omogenate de mucoase neperfuzate. Or, în intestin, la nivelul spațiului extracelular stagnează o cantitate notabilă de γG-globulină, fapt dovedit și de prelungirea liniei de precipitare a γG-globulinelor în testul Osserman executat cu soluții perfuzate (fig. 2). Deci, γG-globulina poate fi una din principalele impurități plasmatice prezente în mucoasa recoltată de la intestine neperfuzate.

2. În mucoasa intestinală sînt absente cîteva antigene plasmatice care dau linii de precipitare puternice și se etalează din zona α-glicoproteinelor pînă în zona β_2-globulinelor (fig. 1 *b*). De asemenea, lipsește albumina serică, pe care n-am putut-o evidenția prin nici una din tehnicile imunoelectroforetice utilizate.

3. În extractul de mucoasă intestinală există antigene specifice care diferă de cele din serul de șobolan. Dintre ele atrage atenția linia de precipitare cu aspect difuz etalată în zona α_2 (fig. 1 *c*). Linia nu se colorează cu negru de Sudan, iar poziția ei sugerează un antigen cu o greutate moleculară mare. Tot în această zonă este vizibilă și o linie subțire, așezată deasupra liniei difuze, însă deplasată ușor spre anod.

B. Raporturi antigenice între extractul de mucoasă intestinală și sucul intestinal

Analiza imunoelectroforetică comparativă a mucoasei și a sucului intestinal, efectuată cu ser antimucoasă, conduce la rezultate scontate (fig. 3). Astfel, în sucul intestinal, ca și în mucoasă, nu se pot pune în evidență nici γG-globulina și nici albumina. Aceste două proteine se observă numai dacă sucul intestinal provine de la animale gavate — cu 24 de ore înainte de recoltare — cu o soluție de tripsin-inhibitor și a fost recoltat pe tripsin-inhibitor. Chiar în aceste cazuri n-am reușit întotdeauna să identificăm, prin reacția Osserman cu γG-globulină și albumină pure, prezența acestor două proteine, liniile lor de precipitare fiind în general slabe. Comparînd aceste date cu cele cunoscute pentru sucul intestinal uman [1], ajungem la concluzia că, la șobolan, nu numai albumina dar și γG-globulina manifestă o sensibilitate marcată la atacul enzimelor intestinale.

În sucul intestinal sînt prezente antigene din mucoasa intestinală (fig. 3 *a*). De aceea, după filtrarea anticorpilor antimucoasă prin zona antigenelor din sucul intestinal, la întîlnirea acestora cu reactanții omologi, se formează doar cîteva linii de precipitare în zona α_2-globulinelor și γA-globulinelor. Această comportare arată deci că în sucul intestinal există, în raporturi cantitative schimbate, multe antigene din mucoasa intestinală.

Desigur că în sucul intestinal există și antigene de origine plasmatică, ajunse aici fie în urma trecerii barierei intestinale, fie pe cale biliară. Astfel, un ser de șobolan este capabil să rețină o bună parte din anticorpii antimucoasă, așa că la întîlnirea sucului intestinal cu anticorpii antimucoasă rămași disponibili, aceștia reacționează numai cu grupul de antigene din zona α_2-globulinei (fig. 3 *b*). Aportul bilei în mozaicul antigenic al sucului intestinal poate fi judecat din figura 3 *c*. Linia de precipitare etalată în zona β_1 (transferină?) nu este specifică bilei, deoarece ea dispare prin filtrarea serului antimucoasă peste suc intestinal, în timp ce linia de precipitare din zona anodică (α_1-glicoproteină?) rămîne nealterată. Această comportare pare să arate că din sucul intestinal lipsește acest antigen biliar, care în schimb este prezent în mucoasa intestinală în cantități suficiente pentru a declanșa sinteza anticorpilor specifici.

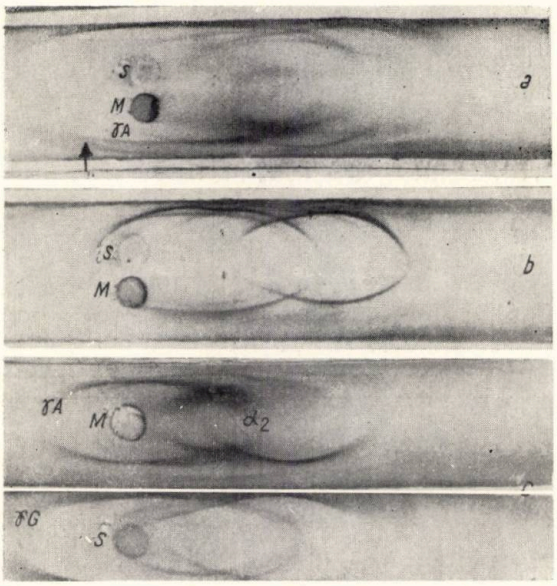


Fig. 1. — Analiza imunoelectroforetică a serului sanguin de șobolan și a extractului de mucoasă intestinală de șobolan cu ser imun de iepure anti-ser de șobolan și anti-mucoasă intestinală de șobolan.

a și *c* — în șanțuri s-a introdus serul antimucoasă. *b* — în șanțuri s-a introdus serul anti-ser sanguin, *S* = ser sanguin de șobolan; *M* = extract de mucoasă.

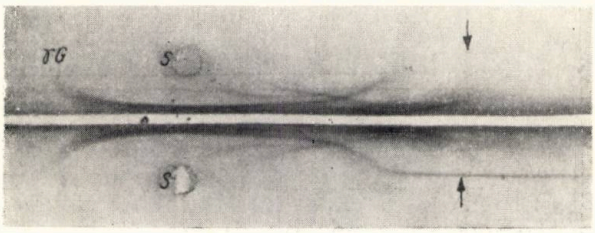


Fig. 2. — Identificarea imunoelectroforetică a γG-globulinelor de șobolan din perfuzatul de intestin.

În șanțul din mijloc s-a introdus serul antimucoasă; în șanțul superior s-a introdus perfuzatul obținut după 15—20 de minute de la începerea perfuziei, iar șanțul de jos s-a umplut cu o soluție 0,2% de γG-globulină de șobolan.

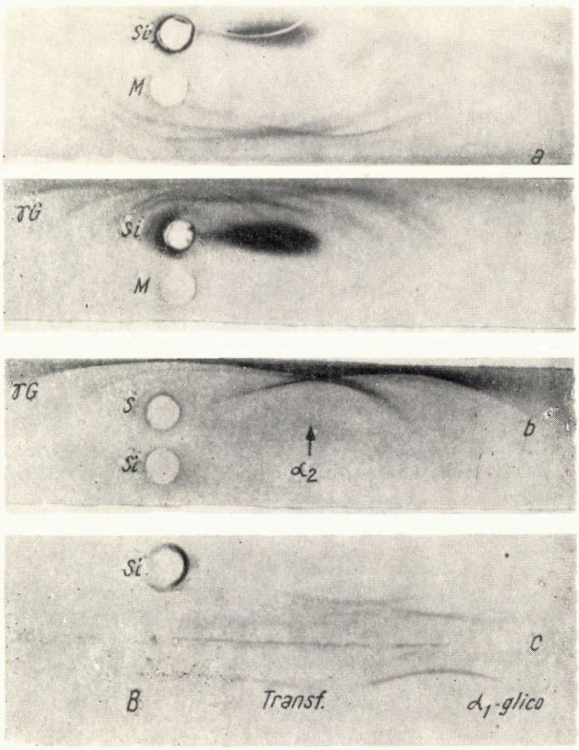


Fig. 3.— Analiza imunoelectroforetică a sucului intestinal și a extractului de mucoasă intestinală de șobolan cu ser imun de iepure antimucoasă intestinală de șobolan.

Si = suc intestinal; *M* = mucoasă intestinală; *S* = ser sanguin; *B* = bilă.

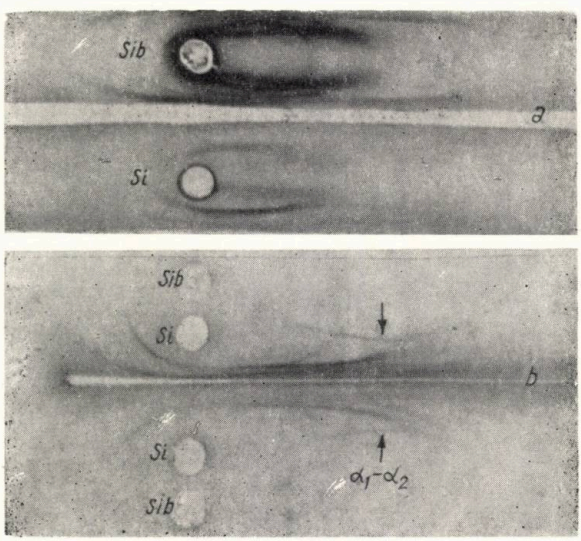


Fig. 4. — Evidențierea unui antigen nou în sucurile intestinale obținute de la șobolani cu canalul biliar ligaturat.

Si = suc intestinal martor; *Sib* = suc intestinal fără bilă; *M* = mucoasă intestinală.

C. Raporturi antigenice între sucurile intestinale recoltate de la animale cu canalul biliar ligaturat și neligaturat (martor)

Oprirea accesului de bilă în duoden, cu 24 de ore înainte de recoltarea sucului intestinal, are drept consecință decolorarea aproape completă (de multe ori totală) a sucurilor și apariția unei hiperbilirubinemii, consecință a icterului mecanic prin obstrucție.

Din punct de vedere imunoelectroforetic, se constată că în absența bilei diagramele sînt mai complexe, ca și cum aceste sucuri ar poseda un număr mai mare de antigene decît cele normale (cu bilă) (fig. 4 *a*).

Analizate prin tehnica imunoelectroforetică comparată, aceste constatări nu se verifică decît în parte (fig. 4 *b*) : în sucurile intestinale fără bilă se constată apariția constantă a unui antigen nou, cu o mobilitate electroforetică cuprinsă între cea a α_1- și α_2-globulinelor (însemnat cu săgeată). Rezultă că imaginea mai complexă semnalată mai înainte (fig. 4 *a*) era datorită creșterii cantității unor antigene care existau în sucurile normale numai în cantități mici, nedecelabile imunoelectroforetic.

Apariția antigenului nou am putut-o reproduce de 6 ori, utilizînd de fiecare dată 3 șobolani, în experiențe extinse într-un interval de 9 luni. Considerăm această reproductibilitate ca o garanție că fenomenul constatat nu este rezultatul unor factori accidentali, dependenți de alimentație, vîrstă sau anotimp.

Pentru a explica prezența noului antigen în sucul intestinal fără bilă am încercat să verificăm mai multe ipoteze :

1. *Acțiunea distructivă directă a bilei.* Această presupunere s-a infirmat prin experiențe care au arătat că incubarea *in vitro*, la 37°C, cu cantități variabile de bilă și la diferite intervale de timp (1-3 ore), a sucului intestinal recoltat de la animale cu canalul biliar ligaturat, nu determină dispariția antigenului.

2. *Icterul mecanic prin obstrucție.* La nivelul intestinului pot ajunge pe cale sanguină factori care, direct sau indirect, pot fi responsabili pentru apariția antigenului. Și această presupunere a fost infirmată prin experiențe care au dovedit că în sîngele animalelor cu canalul biliar ligaturat nu se găsește nici antigenul nou și nici factori care, în contact cu sucul intestinal (*in vitro*), să determine apariția antigenului.

3. *Inhibarea activității enzimelor proteolitice în absența bilei.* Această inhibare ar putea avea drept consecință generală creșterea concentrației proteice a sucurilor intestinale fără bilă (ceea ce se constată experimental), cu păstrarea nealterată a unui antigen care nu se hidrolizează decît în prezența bilei. Desigur că influența bilei asupra procesului hidrolitic nu poate fi directă, deoarece am arătat mai sus că adăugarea de bilă peste sucul intestinal ce conține antigenul nou nu determină dispariția acestuia. Că apariția antigenului nou este oarecum independentă de activitatea triptică, o dovedesc experiențele noastre care au arătat că, indiferent de faptul că proteinele din sucuri sînt protejate, prin adăugare de tripsin-inhibitor la recoltare, sau neprotejate, s-au obținut aceleași rezultate.

4. *Agresiunea enzimelor proteolitice asupra mucoasei intestinale în absența bilei.* Această explicație pleacă de la faptul, dovedit experimental, că antigenul nou apărut în sucul intestinal există în mucoasa intestinală. Se poate presupune deci că apariția lui în sucul intestinal este o conse-

cinţă a agresiunii enzimelor proteolitice asupra celulelor mucoasei, care eliberează astfel acest antigen. Se subînţelege deci că bila are rolul de a proteja mucoasa şi că absenţa ei nu numai că nu diminuează activitatea enzimelor hidrolitice, dar ar putea-o chiar exalta, datorită absenţei α_1-antitripsinei (α_{1AT_I}), prezentă în bilă. Această explicaţie nu este însă susţinută de datele noastre experimentale, care au arătat că gavarea cu tripsin-inhibitor a şobolanilor cu coledocul legat cu 24 şi 1,5 ore înainte de recoltarea sucului nu suprimă apariţia antigenului nou. Or, dacă el este rezultatul agresiunii hidrolitice a tripsinei asupra celulelor mucoasei, aşa cum s-a presupus mai sus, ar trebui ca o dată oprită acţiunea tripsinei să dispară şi efectul ei (apariţia antigenului nou), ceea ce nu s-a constatat. Acest fapt experimental nu este la rîndul lui ireproşabil, deoarece se poate presupune că antigenul rezultă din acţiunea unei alte enzime proteolitice care nu este influenţată de tripsin—inhibitorul administrat.

Raportînd aceste constatări experimentale la cazurile patologice în care accesul bilei în duoden este redus sau oprit, se pot face supoziţii privitoare la posibilitatea ca—în timp—acest antigen să fie răspunzător pentru o autoagresiune care ar sta la baza unor gastroenteropatii [11].

CONCLUZII

În mucoasa intestinală de şobolan există un grup de proteine plasmatice, dintre care se distinge γA-globulina. Cum mucoasa provine de la intestine perfuzate, rezultă că γA-globulina este sintetizată la acest nivel şi nu adusă aici prin extravazarea sîngelui. Această concluzie se poate extinde şi asupra celorlalte proteine plasmatice prezente aici, cu rezerva că ele s-ar putea găsi în celulele mucoasei, fiind supuse aici proceselor de catabolizare [3].

În mucoasă există şi antigene specifice, dintre care se detaşează un antigen cu mobilitatea α_2-globulinelor, lipsit de lipide şi cu greutate moleculară mare.

O bună parte din antigenele mucoasei intestinale se găsesc şi în sucul intestinal, însă în raporturi cantitative schimbate. Se notează şi prezenţa unor antigene de origine plasmatică, care pot ajunge aici fie în urma trecerii barierei intestinale, fie pe cale biliară. Absenţa albuminei şi γG-globulinei în sucul intestinal arată că, la şobolan, atît albumina cît şi γG-globulina sînt sensibile la acţiunea distructivă a enzimelor intestinale.

Oprirea accesului bilei în duoden determină apariţia în sucul intestinal a unui antigen nou. Acesta poate rezulta fie din incapacitatea proteazelor intestinale de a degrada, în absenţa bilei, un antigen preexistent în suc, fie din agresiunea acestor proteaze, în absenţa bilei, asupra celulelor mucoasei care conţin acest antigen. În ambele cazuri, în sucul intestinal al animalelor cu accesul bilei spre intestin oprit apare un antigen nou, care poate juca un rol imunopatologic.

Institutul de biochimie
al Academiei Republicii Socialiste
România, Bucureşti

Prezentat la redacţie la 18 septembrie 1967

BIBLIOGRAFIE

1. H. E. Schultze, S. F., Heremans, *Molecular biology of human proteins*, Elsevier, Amsterdam-London-New York, 1966, I, 789—795 .
2. V. Gheție, C. Medeșan, N. St. Chișiu, *Distribuția și modificarea antigenicității albuminei umane fluorescente reținută în organele, celulele și umorile unor animale de experiență*, St. cerc. biochim. **10**, 19, 1967.
3. V. Gheție, C. Medeșan, N. St. Chișiu, *Retention and degradation of fluorescent human albumin by the small intestine of rats perfused in situ*, Rev. roum. Biochim. **4**, 119, 1967.
4. N. St. Chișiu, *Constituants antigéniques propres et d'origine sanguine dans la bile hépatique et vésiculaire humaine*, Rev. roum. Biochim. **3**, 207, 1966.
5. Y. Cohen, *Technique de perfusion vasculaire d'anse intestinale de rat in situ*, J. Physiol., Paris, **45**, 244, 1953.
6. E. F. Osserman, *A modified technique of immunoelectrophoresis facilitating the identification of specific precipitin arcs*, J. Immunol. **84**, 93, 1960.
7. N. St. Chișiu, *Differential and comparative immunoelectrophoresis with selective zonal retention (precipitation) of some antibodies*, Rev. roum. Biochim. **5**, 1968 (sub tipar).
8. S. E. Michael, *The isolation of albumin from blood serum or plasma by means of organic solvents*, Biochem. J. **82**, 212, 1962.
9. J. L. Fahey, A. P., Horbett, *Human gamma-globulin fractionation on anion exchange cellulose columns*, J. biol. Chem. **234**, 2645, 1959.
10. P. Crabbé, A. O. Carbonara, S. F. Heremans, *The normal human intestinal mucosa as a major source of plasma cells containing γA-immunoglobulin*, Lab. Invest. **14**, 235, 1965.
11. K. B. Taylor, *Role of immune responses in the gastrointestinal tract*, Fed. Proc. **24**, 23, 1965.

ANTIGENIC RELATIONSHIPS BETWEEN SERUM, INTESTINAL MUCOSA AND INTESTINAL JUICE OF RATS, WITH PARTICULAR REFERENCE TO THE APPEARANCE OF A NEW ANTIGEN IN THE INTESTINAL JUICE AFTER STRINGING THE BILIAR DUCT

SUMMARY

It was shown that in rat intestinal mucosa there are not only specific antigens but also antigens of plasmatic origin, among which the γ A-globulins are well represented.

In the intestinal juice there are many antigens which arise from the intestinal mucosa besides of a number of antigens present also in serum and arrived in lumen either by the passage of intestinal mucosa or by biliar way.

In the intestinal juice of animals with stringed biliar duct, a new antigen was distinguished with an electrophoretic mobility between that of α_1- and α_2-globulins.

The reasons which may lead to the appearance of antigens and its implications in the immunopathological processes at intestinal level are discussed.

ST. CERC. BIOCHIM., II, 1, 25–31 (1968)

METABOLISMUL PROTIDIC ÎN INTOXICAȚIA EXPERIMENTALĂ CU TETRACLORURĂ DE CARBON ȘI CLOROFORM

I. INCLUDEREA METIONINEI-^{35}S ÎN COMPARTIMENTELE SUBCELULARE ALE FICATULUI DE ȘOBOLAN ÎN INTOXICAȚIA ACUTĂ

HIRSCHFELD, A. KOVÁCS, EUGENIA GOINA, POMPILIA FURDA și VICTORIA GEANGALĂU

Rezumat. — Animalelor intoxicate în prealabil cu tetraclorură de carbon și cloroform li s-a administrat ^{35}S-metionină i.m. S-a cercetat ritmul includerii metioninei în compartimentele subcelulare hepatice, pe o perioadă de 5 zile. În hialoplasmă + miocrozomi se relevă creșterea conținutului proteic, concomitent cu o includere mai accentuată a ^{35}S-metioninei. În mitocondrii se remarcă o reîncorporare pronunțată a aminoacidului marcat. Se constată o circulație intracelulară a radioactivității din hialoplasmă + microzomi spre mitocondrii și nuclei, respectiv din nuclei în mitocondrii. Aceste procese sînt mai lente și mai puțin evidente la animalele intoxicate. Se discută explicațiile și mecanismele probabile ale rezultatelor.

Sinteza proteinelor, generarea și utilizarea energiei metabolice, precum și procesele de reglare sînt fenomene fundamentale ale vieții celulare. Mecanismul lor a fost amplu studiat și multe probleme din acest domeniu au fost pînă astăzi elucidate. În schimb, studiul localizării și integrării lor, interdependența funcțională a structurilor intracelulare în procesele metabolice, deși au format obiectul a numeroase investigații din ultimul deceniu, prezintă încă multe lacune și date contradictorii. În baza acestor considerente ne-am propus urmărirea vehiculării aminoacizilor marcați între diferitele compartimente subcelulare.

Majoritatea datelor din literatură se referă la dinamica includerii aminoacizilor marcați în primele minute și ore după administrare, în legătură cu studiul intensității și localizării biosintezei proteice [29]. În investigațiile noastre am urmărit soarta acestor aminoacizi marcați în decurs de 5 zile, pentru decelarea proceselor de schimb care au loc ulterior la nivelul compartimentelor subcelulare. Am pornit de la ipoteza că proteinele sintetizate în anumite zone ale celulei nu se ancorează exclusiv la locul lor de formare, ci sînt transportate în diferite compartimente, din motive atît funcționale cît și reglatoare.

În aceste procese, permeabilitatea diferitelor membrane din celulă joacă un rol decisiv. Ca atare, ne-am servit de toxice celulare care alterează profund structura membranelor lipidice, ca tetraclorura de carbon și cloroformul [24], [30]. Aceste toxice pot produce degenerarea grăsoasă

şi necrozarea hepatocitului [18], [30] sau fibrozarea celulei [4], [5], [8], iar în anumite condiţii chiar degenerarea malignă [10], [11], [12],[23].

În comunicarea de faţă publicăm un studiu asupra dinamicii includerii metioninei marcate-^{35}S în diferitele fracţiuni subcelulare hepatice în intoxicarea acută cu tetraclorură de carbon şi cloroform.

MATERIAL ŞI METODE

Operaţiile s-au efectuat pe 2 loturi de cîte 16 şobolani albi în greutate de 150±25g. Un lot a fost intoxicat timp de 3 zile cu tetraclorură de carbon şi cloroform (2 părţi CCl_4 + 2 părţi $HCCl_3$ + 6 părţi ulei de floarea soarelui), în doze de 0,3—0,5—0,5 ml/100 g corp, administrate s.c. Al doilea lot a servit drept martor.

La 5 zile după începerea tratamentului, toate animalele au fost injectate i.m. cu cîte 20 microCi/100 g metionină marcată cu ^{35}S (activitate specifică 28 mCi/mM, „Izotop" U.R.S.S) în 0,5 ml sol. fiziologică. Cîte 4 animale intoxicate şi 4 martore au fost sacrificate la 2 ore, 24 de ore, 3 zile şi 5 zile după inoculare. Ficatul prelevat a fost spălat cu o soluţie de 0,25 M zaharoză + 0,0018 M $CaCl_2$ şi uscat prin tamponare cu hîrtie de filtru. S-a determinat greutatea organului şi, după o diluţie de 10 ori cu aceeaşi soluţie de zaharoză, s-a omogenizat cu aparatul Potter. Prin centrifugare fracţionată după Hogeboom [15] s-au separat următoarele fracţiuni subcelulare: fracţiunea I: nuclei (N); fracţiunea II: mitocondrii (M); fracţiunea III: supernatant [S], compusă din hialoplasmă şi microzomi. Toate operaţiile s-au executat la rece, în jur de +4°C.

S-a determinat în castel cu plumb, cu contor Geiger-Müller (fereastră frontală 1,7 mg /cm^2), în condiţii geometrice identice, radioactivitatea unei porţiuni determinate de preparat. Conţinutul proteic al preparatelor s-a determinat cu metoda biuretului [17].

Rezultatele sînt redate în impulsuri pe minut (i.p.m.) la 100 mg ţesut proaspăt, redus la o concentraţie de 1% proteine. Pentru a reduce divergenţele individuale dintre greutatea corporală, greutatea hepatică şi a conţinutului în proteine, existente în cadrul aceleiaşi grupe de animale, am analizat ritmul procesului de includere, calculînd şi anumiţi coeficienţi. Astfel, am raportat la fiecare animal în parte radioactivitatea unor fracţiuni la radioactivitatea omogenatului, precum şi radioactivitatea fracţiunilor între ele. Prelucînd aceşti coeficienţi, am găsit raporturi mult mai omogene în cadrul aceloraşi grupe. De aceea considerăm mai fidele rezultatele astfel obţinute eliminîndu-se pe această cale o serie de factori care deranjează şi estompează diferenţele reale existente între grupe. Totodată acest mod de analiză permite şi compararea rezultatelor între diferitele compartimente. Un avantaj tehnic al acestei metode este şi faptul că ea ne scuteşte de efectuarea unei serii de corecţii suplimenatre, inerente metodelor de lucru cu izotopi radioactivi.

Prelucrarea şi analiza statistică s-a efectuat aplicînd testul "t" al lui Student.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

I. În cursul intoxicaţiei, animalele scad în greutate. Histologic ficatul prezintă o degenerescenţă grăsoasă — vizibilă de altfel şi macroscopic. Volumul ficatului creşte în urma intoxicaţiei: astfel, raportul greutate hepatică × 100/greutate corp este, în medie, de 3,85±0,36% la animalele martore, şi creşte la 5,26±0,52% la lotul intoxicat (diferenţă foarte semnificativă: $p<0,001$).

II. În privința conținutului în protide nu se remarcă diferențe apreciabile între lotul martor și cel intoxicat. La lotul intoxicat doar conținutul protidic al supernatantului (hialoplasmă + microzomi) este statistic semnificativ crescut față de martori ($p<0,05$, vezi tabela 1).

Tabela 1

Conținutul proteic în procente al fracțiunilor subcelulare hepatice

	Omogenat	Nuclei	Mitocondrii	Supernatant
Martori	31,1±1,09	42,8±2,23	29,2±1,27	22,5±0,50
Intoxicația acută	29,7±1,34	45,1±2,18	28,0±0,95	23,8±0,76
p	n.s.	n.s.	n.s.	<0,05

III. Din analiza datelor din figura 1 reiese că maximele includerii aminoacidului marcat se găsesc în general la 2 ore, urmate de scăderea radioactivității.

Omogenatul integru (*O*) prezintă o includere inițială mai marcată la lotul intoxicat decît la martori ($p<0,05$).

În cazul nucleilor, cele două curbe nu prezintă diferențe semnificative.

Radioactivitatea fracțiunii mitocondriale scade treptat la martori după 2 ore, scăderea devenind semnificativă abia după 5 zile ($p<0,01$). La lotul intoxicat, în schimb, se remarcă o creștere netă (reincludere) după a 3-a zi, diferențele devenind nesemnificative față de valoarea inițială.

Fracțiunea III, supernatantul (hialoplasma + microzomi), este cea mai activă. Includerea inițială — la 2 ore — a lotului intoxicat este net superioară martorilor ($p < 0,01$). Ulterior, cedarea izotopului fiind de asemenea mai marcată, diferențele între cele două loturi dispar.

Analizînd raporturile includerii aminoacidului marcat între diferitele fracțiuni celulare (vezi tabela 2), rezultă următoarele:

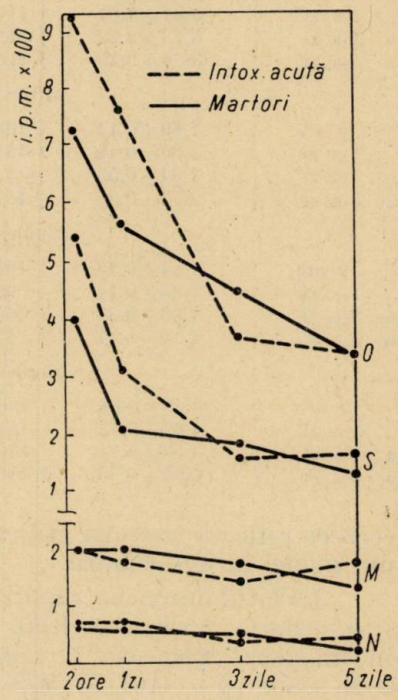


Fig. 1. — Dinamica includerii ^{35}S-metioniei în fracțiunile subcelulare ale ficatului.

i.p.m. = impulsuri pe minut; *O* = omogenat *S* = supernatant (hialoplasmă + microzomi) *M* = mitocondrii: *N* = nuclei

La martori, în prima zi, raportul O/M scade ($p < 0,05$), iar rapoartele M/S și N/S cresc semnificativ ($p < 0,02$ și $p < 0,05$) față de valorile inițiale de 2 ore. Acestea denotă o trecere a radioactivității din omogenat în mitocondrii, respectiv din supernatant în mitocondrii și nuclei. Între ziua a 3-a și a 5-a raportul O/N crește ($p < 0,01$) și N/M scade ($p < 0,01$),

Tabela 2

Raportul între radioactivitatea fracţiunilor subcelulare hepatice

Timpul	Martori			Intoxicaţie acută		
	K	%	p	*K*	%	p
			Omogenat/Nuclei			
2 ore	1,06±0,23	100		1,27±0,34	100	
1-a zi	0,83±0,14	78		1,18±0,34	93	
a 3-a zi	0,74±0,16	70	>0,01	0,86±0,10	67	
a 5-a zi	1,24±0,16	114		0,91±0,15	71	
			Omogenat/Mitocondrii			
2 ore	1,91±0,19	100	>0,05	2,63±0,38	100	
1-a zi	1,50±0,17	78		2,13±0,25	81	>0,01
a 3-a zi	1,41±0,20	73		1,42±0,17	54	
a 5-a zi	1,40±0,17	73		1,12±0,10	42	
			Omogenat/Supernatant			
2 ore	3,25±0,50	100		2,31±0,32	100	>0,02
1-a zi	3,81±0,61	117		3,29±0,43	142	
a 3-a zi	3,73±0,72	115		3,53±0,95	152	
a 5-a zi	3,78±0,30	116		3,20±0,31	138	
			Mitocondrii/Supernatant			
2 ore	1,69±0,14	100	>0,02	0,89±0,19	100	>0,01
1-a zi	2,55±0,49	151		1,55±0,17	174	>0,02
a 3-a zi	2,64±0,53	156		2,45±0,43	275	
a 5-a zi	2,72±0,37	157		2,84±0,31	319	
			Nuclei/Mitocondrii			
2 ore	1,84±0,28	100		2,18±0,58	100	
1-a zi	1,83±0,11	99		1,89±0,48	87	>0,05
a 3-a zi	1,96±0,31	106	>0,01	1,67±0,15	76	
a 5-a zi	1,14±0,17	62		1,26±0,25	58	
			Nuclei/Supernatant			
2 ore	3,10±0,68	100	>0,05	1,95±0,38	100	
1-a zi	4,67±0,73	151		2,93±0,48	150	>0,02
a 3-a zi	3,73±0,71	120		4,08±0,74	209	
a 5-a zi	3,09±0,50	100		3,54±0,30	181	

ceea ce reflectă trecerea radioactivităţii din nuclei în omogenat, respectiv din nuclei în mitocondrii.

La lotul intoxicat, raporturile O/S şi M/S cresc în prima zi ($p < 0,02$ şi $p < 0,01$). Aceasta reflectă o trecere a radioactivităţii din supernatant în omogenat, respectiv în mitocondrii. Între prima şi a treia zi raportul O/M scade ($p < 0,01$) şi M/S creşte ($p < 0,02$), ceea ce denotă trecerea radioactivităţii din omogenat în mitocondrii, respectiv din supernatant în mitocondrii. Scăderea raportului N/M devine semnificativă abia după 5 zile faţă de valorile iniţiale ($p < 0,05$), iar creşterea raportului N/S după 3 zile ($p < 0,02$). Aceasta se interpretează ca o trecere mai lentă a radioactivităţii din supernatant în nuclei, şi din nuclei în mitocondrii.

Din datele de mai sus rezultă că, în condiţii normale, aminoacidul marcat se include iniţial în hialoplasmă şi reticulul endoplasmatic (*S*), trecînd apoi parţial în mitocondrii şi nuclei. Ulterior asistăm la un transport din nuclei înspre mitocondrii. În cursul intoxicaţiei acute, această circulaţie

dinspre supernatant spre mitocondrii și nuclei, și din nuclei înspre mitocondrii, devine mai lentă și mai puțin pronunțată.

Se cunoaște de mult timp că locul primar de atac al tetraclorurii de carbon este ficatul [3]. După date recente, acțiunea CCl_4 asupra organismului se manifestă prin mecanisme hormonale și nervoase [2], [19]. După Slater [26], nocivitatea CCl_4 asupra hepatocitului este precedată de metabolizarea ei, iar Paul [22] a arătat că, în organism, CCl_4 se transformă rapid în cloroform. Din acest punct de vedere, administrarea simultană de CCl_4 și $HCCl_3$ accentuează acțiunea toxică.

Creșterea conținutului proteic al compartimentului hialoplasmatic și microzomial, la lotul intoxicat, precum și includerea mai accentuată a aminoacidului marcat în aceste compartimente, pot fi considerate ca semne ale dereglării biosintezei proteice. Degradarea proteinelor se accelerează de asemenea în cursul intoxicației [21], [28]. Se poate presupune că această creștere a metabolismului proteic este o reacție a organismului la excitantul toxic, în vederea formării de paraproteine sau lipoproteine [31], pentru neutralizarea agentului toxic.

Schimbările survenite în circulația intracelulară a proteinelor între diferitele compartimente subcelulare se datoresc, probabil, leziunii membranelor nucleare și mitocondriale [16], [24], [26]. Reincluderea pronunțată de la nivelul mitocondriilor ar reflecta o biosinteză accelerată a proteinelor din acest compartiment, cauzată de pierderea enzimelor mitocondriale în urma creșterii permeabilității membranelor acestora [7], [13], [14], [27].

Se știe că administrarea colinei sau a unui regim bogat în proteine — respectiv restricția grăsimilor — atenuează leziunile hepatice [9]. Regenerarea hepatică este de asemenea accelerată de metionină, atît prin grupările sale metilice, cît și prin introducerea grupărilor SH-, scăzute în cursul intoxicației [1], [6], [20], [25]. Întrucît regenerarea hepatică are loc chiar în cursul intoxicației, în vecinătatea focarelor necrotice [8], rezultă că în condițiile noastre de experiență — de la 1 pînă la 6 zile după administrarea toxicului — procesele observate sînt rezultanta atît a leziunilor toxice, cît și a proceselor de regenerare celulară. Acest fapt implică reluarea investigațiilor pe modele mai simple, unde cele două procese să poată fi cercetate separat.

CONCLUZII

1. În cursul intoxicației acute cu tetraclorură de carbon și cloroform a șobolanilor albi, se instalează o degenerare grăsoasă a ficatului, însoțită de creșterea volumului hepatic.

2. În fracțiunea a III-a (hialoplasmă+microzomi) conținutul proteic crește, concomitent cu o includere mai accentuată a aminoacidului marcat.

3. În mitocondriile animalelor intoxicate se remarcă o reincludere pronunţată a aminoacidului marcat, la a 5-a zi.

4. Trecerea radioactivităţii din supernatant în nuclei şi mitocondrii este întîrziată în intoxicaţie, la fel şi trecerea ulterioară din nuclei în mitocondrii, aceste procese fiind mai accentuate la lotul martor.

5. Aceste dereglări reflectă atît leziunile provocate de toxice în metabolismul protidic, cît şi procesele de regenerare hepatice.

Prezentată la redacţie la 21 iunie 1967

Catedra de biochimie a Institutului de Medicină şi Farmacie Tîrgu-Mureş

BIBLIOGRAFIE

1. J. Beatlie, P. H. Herbert, C. Wechtel, C. W. Steele, Brit. med. J., *1*, 209 (1944).
2. T. M. Brody, D. N. Calvert, Amer. J. Physiol., *198*, 682 (1960).
3. G. R. Cameron, W. A. E. Karunaratne, J. Path. Bakt., *42*, 1 (1936).
4. A. Costa, Arch. de Vecchi. anat. pat., *39*, 259 (1963).
5. A. Costa, Ibidem, *39*, 303 (1963).
6. M. B. Chenoweth, C. L. Hake, Ann. Rev. Farm., *2*, 363 (1962).
7. G. S. Christie, J. D. Judah, Proc. Soc., *B*, *142*, 241 (1954).
8. R. Discher, Ges. Exp. Med., *136*, 500 (1963).
9. J. Dvorackova, Arch. f. toxikol., *20*, 72 (1963).
10. J. E. Edwards, J. Nat. Cancer Inst., *2*, 197 (1941).
11. J. E. Edwards, Ibidem, *3*, 19 (1942).
12. A. B. Eschenbrenner, Ibidem, *5*, 251 (1945).
13. C. F. Fox, B. D. Dinman, W. J. Frajola, Proc. Soc. exp. Biol. N. Y., *111*, 731 (1962).
14. C. H. Gallacher, K. R. Rees, Nature (London), *187*, 148 (1960).
15. G. H. Hogeboom, J. biol. Chem., *196*, 111 (1952).
16. J. D. Judah, K. R. Rees, Biochem. Soc. Symp., *16*, 94 (1959).
17. G. R. Kingsley, J. biol. Chem., *133*, 731 (1940).
18. G. F. Kiplinger, J. Nat. Cancer Inst., *30*, 837 (1963).
19. A. J. Maximchunck, D. Rubinstein, Canad. J. Biochem. Physiol., *41*, 525 (1963).
20. L. L. Miller, J. F. Ross, G. H. Whipple, Amer. J. Med. Sci., *200*, 749 (1940).
21. A. Niklas, E. Quincke, W. Maurer, H. Neyen, Biochem. Z., *330*, 1 (1958).
22. B. B. Paul, J. Farmacol. Exp. Ther., *141*, 141 (1963).
23. G. Della Porta, J. Nat. Cancer Inst., *26*, 855 (1961).
24. K. R. Rees, W. G. Spector, Nature (London), *190*, 821 (1961).
25. D. O. Schills, Med. J. Aust., *2*, 729 (1958).
26. T. F. Slater, Biochem. Pharmacol., *14*, 178 (1965).
27. T. F. Slater, B. C. Sawyer, U. D. Strauli, Biochem. Farmacol., *15*, 1273 (1966).
28. R. W. Swick, J. biol. Chem., *231*, 751 (1958).
29. H. Tarver, M. Rothstein, în H. Schwiegk u. F. Turba, Künstl. Radioakt. Isotope in Physiol., Diagn. u. Therapie, Springer, Berlin, 1961, B. I.
30. G. G. Villela, Biochem. Pharmacol., *13*, 665 (1964).
31. I. Weinstein, G. Dishmon, M. Heimberg, Bicchem. Pharmacol., *15*, 851 (1966).

DER EIWEISSSTOFFWECHSEL BEI EXPERIMENTELLER TETRACHLORKOHLENSTOFF- UND CHLOROFORMVERGIFTUNG.

I. DIE EINVERLEIBUNG VON ^{35}S-METHIONIN IN DIE SUBZELLULÄREN KOMPARTIMENTE DER RATTENLEBER BEI AKUTER VERGIFTUNG

ZUSAMMENFASSUNG

Den vorher mit Tetrachlorkohlenstoff und Chloroform vergifteten Tieren wurde ^{35}S-Methionin i.m. verabreicht und der Rythmus der Methionineinverleibung in die subzellulären Leberkompartimente während einer Dauer von 5 Tagen verfolgt. In der Hialoplasma + Mikrosomen-Fraktion wurde ein Anwachsen des Proteingehaltes mit einer gleichzeitig betonteren ^{35}S-Methionineinverleibung beobachtet. In den Mitochondrien findet eine verstärkte Einverleibung der markierten Aminosäure statt. Es wird auch eine intrazelluläre Zirkulation der Radioaktivität aus dem Hialoplasma+Mikrosomen den Mitochondrien und Kernen zu, sowie aus den Kernen in die Mitochondrien festgestellt. Diese Vorgänge sind bei den vergifteten Tieren langsamer und weniger offensichtlich. Es werden die möglichen Mechanismen und Auslegungen der Ergebnisse besprochen.

ST. CERC. BIOCHIM., II, 1, P. 33–37 (1968)

METABOLISMUL PROTIDIC ÎN INTOXICAȚIA EXPERIMENTALĂ CU TETRACLORURĂ DE CARBON ȘI CLOROFORM

II. INCLUDEREA METIONINEI-^{35}S ÎN COMPARTIMENTELE SUBCELULARE ALE FICATULUI DE ȘOBOLAN ÎN INTOXICAȚIA CRONICĂ

I. HIRSCHFELD, A. KOVÁCS, EUGENIA GOINA, A. LÁSZLÓ și POMPILIA FURDA

Rezumat. — După un tratament de 11 săptămîni cu tetraclorură de carbon și cloroform, s-a administrat șobolanilor albi 20 microCurie metionină-^{35}S i.m. S-a urmărit timp de 5 zile ritmul includerii metioninei marcate în compartimentele subcelulare ale ficatului. Fibroza hepatică este însoțită de creșterea conținutului proteic al ficatului, precum și al fracțiunii hialoplasmă + microzomi. Încorporarea aminoacidului marcat este scăzută la toate fracțiunile, atît față de martori, cît și față de loturile cu intoxicație acută. Scăderea includerii aminoacidului în mitocondrii se manifestă și prin atingerea întîrziată a maximului curbei — abia la 24 de ore — față de 2 ore la lotul martor. Se remarcă diferențe variabile și în privința circulației radioactivității între nuclei și mitocondrii, respectiv între nuclei și supernatant, a căror semnificație se discută.

Intoxicarea acută cu tetraclorură și cloroform se caracterizează, la șobolanii albi, prin degenerarea grăsoasă și necroza parenchimului hepatic. Aceasta se reflectă, la nivelul metabolismului proteic, prin schimbarea spectrului enzimatic al ficatului [1], precum și prin variații în intensitatea și dinamica includerii metioninei marcate cu ^{35}S în diferite compartimente subcelulare hepatice [2]. Intoxicarea cronică cu tetraclorură de carbon și cloroform provoacă ciroza ficatului și schimbări profunde în structura hepatocitului [3], caracterizate, printre altele, prin scăderea numărului mitocondriilor.

Ca o completare a investigațiilor noastre anterioare, s-au cercetat, în condițiile intoxicației cronice cu tetraclorură de carbon și cloroform, variațiile metioninei marcate cu ^{35}S în diferite compartimente subcelulare hepatice și dereglările survenite în dinamica acestor procese.

MATERIAL ȘI METODE

Treizeci de șobolani albi, în greutate de 150±25 g, au fost injectați s.c., de 2 ori pe săptămînă, timp de 11 săptămîni, cu cîte 0,5 ml CCl_4 + $HCCl_3$/100 g corp (2 părți CCl_4 + 2 părți $HCCl_3$ + 6 părți ulei de floarea-soarelui). La sfîrșitul perioadei de tratament, s-a administrat i.m., în membrul posterior stîng al celor 14 animale rămase în viață, cîte 20 microCi/100 g corp metionină-^{35}S în 0,5 ml sol. fiziologică (activitate specifică 25 mCi/mM, „IZOTOP" U.R.S.S.). Operațiunile ulterioare sînt descrise detaliat în nota I.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

I. În intoxicarea cronică, raportul greutate ficat $\times 100$/g corp creşte (martori : 3,85%, intoxicaţi cronic : 4,76%, $p < 0,001$), fără să atingă însă pe cea observată în cursul intoxicaţiei acute, de 5,26%. Histologic, ficatul prezintă o fibroză caracteristică.

II. Conţinutul proteic al omogenatului creşte semnificativ în intoxicaţia cronică, faţă de martori : $p < 0,01$ (vezi tabela 1). La nivelul fracţiunilor, numai supernatantul (hialoplasmă+microzomi) arată o creştere semnificativă ($p < 0,05$).

Tabela 1

Conţinutul proteic în procente al fracţiunilor subcelulare hepatice

	Omogenat	Nuclei	Mitocondrii	Supernatant
Martori	31,1±1,09	42,8±2,23	29,2±1,27	22,5±0,50
Intoxicaţia cronică	34,1±1,37	45,1±2,34	28,0±0,95	24,1±0,89
p	<0,01	n.s.	n.s.	<0,05

III. În privinţa includerii metioninei-^{35}S în proteinele fracţiunilor subcelulare, remarcăm (fig. 1) că includerea aminoacidului marcat este în general mai scăzută la lotul intoxicat. În cazul omogenatului, al nucleilor şi al supernatantului, maximele includerii se găsesc la 2 ore. Se remarcă o scădere pronunţată la 24 de ore, la valori care rămîn practic invariabile pînă în ziua a 3-a, cînd apare o nouă scădere.

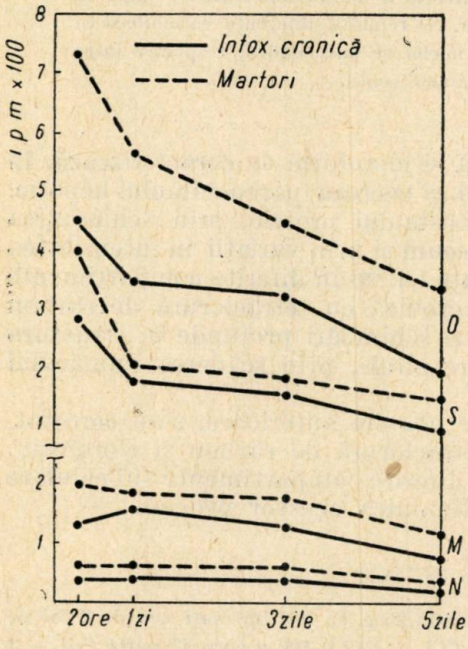


Fig. 1. — Dinamica includerii ^{35}S-metioninei în fracţiunile subcelulare ale ficatului.
i.p.m. = impulsuri pe minut; *O* = omogenat; *S* = supernatant (hialoplasmă + microzomi); *M* = mitocondrii; *N* = nuclei.

La fracţiunea mitocondrială, în schimb, maximul încorporării este atins abia la 24 de ore, urmat de o scădere a radioactivităţii pînă în a 5-a zi. La mitocondriile lotului normal nu se observă acest maxim de includere întîrziat.

Din raporturile includerii ^{35}S-metioninei între diferitele fracţiuni celulare (tabela 2) rezultă că la martori asistăm la o trecere a radioactivităţii din supernatant în mitocondrii şi nuclei, urmată de o deplasare ulterioară a radioactivităţii din nuclei în mitocondrii (vezi pentru detalii nota I).

În intoxicaţia cronică, în prima zi, raportul O/M scade ($p < 0,001$), M/S creşte ($p < 0,01$) şi N/M

Tabela 2

Raportul între radioactivitatea fracțiunilor subcelulare hepatice

Timpul	Martori			Intoxicație cronică		
	K	%	p	K	%	p
			Omogenat/Nuclei			
2 ore	1,06±0,23	100		0,93±0,02	100	
1-a zi	0,83±0,14	78		1,15±0,02	123	
a 3-a zi	0,74±0,16	70	<0,01	1,00±0,18	107	
a 5-a zi	1,24±0,16	114		1,25±0,02	134	
			Omogenat/Mitocondrii			
2 ore	1,91±0,19	100	<0,05	2,00±0,02	100	<0,001
1-a zi	1,50±0,17	78		1,45±0,02	75	
a 3-a zi	1,41±0,20	73		1,40±0,14	70	
a 5-a zi	1,40±0,17	73		1,40±0,02	70	
			Omogenat/Supernatant			
2 ore	3,25±0,50	100		3,10±0,14	100	
1-a zi	3,81±0,61	117		3,33±0,10	107	
a 3-a zi	3,73±0,72	115		2,80±0,14	90	
a 5-a zi	3,78±0,30	116		3,13±0,29	101	
			Mitocondrii/Supernatant			
2 ore	1,69±0,14	100	<0,02	1,53±0,05	100	<0,01
1-a zi	2,55±0,49	151		2,28±0,02	153	
a 3-a zi	2,64±0,53	156		2,13±0,25	140	
a 5-a zi	2,72±0,37	157		2,20±0,17	146	
			Nuclei/Mitocondrii			
2 ore	1,84±0,28	100		2,13±0,12	100	<0,01
1-a zi	1,83±0,11	99		1,30±0,10	62	<0,01
a 3-a zi	1,96±0,31	106	<0,01	1,67±0,10	81	<0,001
a 5-a zi	1,14±0,17	62		1,14±0,02	52	
			Nuclei/Supernatant			
2 ore	3,10±0,68	100	<0,05	3,27±0,12	100	
1-a zi	4,67±0,73	151		2,93±0,30	88	
a 3-a zi	3,73±0,71	120		3,40±0,39	103	<0,02
a 5-a zi	3,09±0,50	100		2,50±0,29	76	

scade semnificativ ($p < 0,01$) față de valorile inițiale de 2 ore. Aceasta reflectă trecerea radioactivității din omogenat în mitocondrii, respectiv din supernatant și nuclei în mitocondrii. În a treia zi raportul N/M crește ($p < 0,01$), ceea ce denotă trecerea radioactivității din mitocondrii în nuclei. În a cincea zi raportul N/M scade din nou ($p < 0,001$), scade și N/S ($p < 0,02$), ca semn al deplasării radioactivității din nuclei în mitocondrii și supernatant. Deci, pe lîngă transportul normal din supernatant în mitocondrii, are loc în cursul intoxicației cronice și o deplasare precoce din nuclei în mitocondrii, absentă la celelalte grupe. Ulterior, radioactivitatea trece din nou din mitocondrii în nuclei, iar după 5 zile, din nuclei în mitocondrii și supernatant.

Interpretînd rezultatele, remarcăm că toxicele administrate pe o perioadă relativ lungă, de 11 săptămîni, au provocat la nivelul ficatului procese fibrozante, decelabile histologic, cu o profundă schimbare şi în structura fină a hepatocitului. Cu toate aceste schimbări radicale în morfologia ficatului, dereglările proceselor biochimice studiate sînt mai puţin izbitoare decît cele din cursul intoxicaţiei acute. Considerăm că acest fapt precum şi încorporarea mai scăzută a aminoacidului marcat în ţesutul hepatic intoxicat în mod cronic se datoresc în parte scăderii proceselor regenerative din acest stadiu.

Modificările proceselor de transport intracelular sînt în schimb mai pronunţate. Subliniem schimburile radicactivităţii care au loc între nuclei şi mitocondrii, şi care sugerează relaţia lor cu procesele reglatoare din nuclei, respectiv cu dereglările metabolismului energetic mitocondrial.

Astfel, migrarea radicactivităţii din supernatant înspre nuclei şi mitocondrii reflectă probabil circulaţia enzimelor sintetizate în microzomi spre nuclei şi mitocondrii. Trecerea radioactivităţii din nuclei în mitocondrii reflectă circulaţia nucleoproteidelor sintetizate în nuclei, şi probabil a altor proteine cu funcţie reglatoare în metabolismul mitocondriilor.

Aceste date ridică problema integrităţii structurii fine subcelulare, în corelaţie cu funcţia diferitelor compartimente subcelulare în procesele metabolice, precum şi reglarea acestora în condiţii normale şi patologice. În vederea abordării acestei laturi a problemei, este necesară investigarea proceselor de permeabilitate la nivel celular şi a compartimentelor celulare, în anumite condiţii. Oricum, considerăm datele noastre experimentale doar ca o abordare a unor probleme privind interrelaţia dintre structură, metabolism şi transporturile intracelulare. Sînt în curs investigaţii pe modele mai simple, în vederea aprofundării naturii şi semnificaţiei proceselor descrise.

CONCLUZII

În cursul intoxicaţiei cronice cu tetraclorură de carbon şi cloroform, ficatul se fibrozează şi creşte în volum. Creşterea conţinutului proteic al fracţiunii III (hialoplasmă + microzomi) este similară celei din intoxicaţia acută. Includerea radioizotopului este scăzută în toate fracţiunile, spre deosebire de intoxicaţia acută, în care încorporarea este similară celei din lotul martor, respectiv mai accentuată în fracţiunea III. Scade includerea aminoacidului marcat în mitocondrii, maximul fiind atins abia la 24 de ore, spre deosebire de 2 ore la lotul martor.

Trecerea radioactivităţii din supernatant în mitocondrii este similară celei din lotul martor. În schimb se remarcă diferenţe variabile în circulaţia radioactivităţii între nuclei şi mitocondrii, respectiv între nuclei şi supernatant, a căror semnificaţie rămîne să fie stabilită.

Prezentat la redacţie la 21 iunie 1967

Catedra de biochimie a Institutului de Medicină şi Farmacie Tîrgu-Mureş

BIBLIOGRAFIE

1. I. Hirschfeld, A. Kovács, Pompilia Furda, B. Katonai, Comunicare la Simpozionul „Medicamente și enzime", Cluj, 1965.
2. I. Hirschfeld, A. Kovács, Eugenia Goina, Pompilia Furda, Victoria Geangalău, această revistă, Nota I.
3. G. G. Villela, Biochem. Pharmacol., **13**, 665 (1964).

DER EIWEISSSTOFFWECHSEL BEI EXPERIMENTELLER TETRACHLORKOHLENSTOFF- UND CHLOROFORMVERGIFTUNG.

II. DIE EINVERLEIBUNG VON ^{35}S-METHIONIN IN DIE SUBZELLULÄREN KOMPARTIMENTE DER RATTENLEBER BEI CHRONISCHER VERGIFTUNG

ZUSAMMENFASSUNG

Nach einer Behandlungsdauer von 11 Wochen mit Tetrachlorkohlenstoff und Chloroform wurde den weissen Ratten 20 Mikro-Curie ^{35}S-Methionin i.m. verabreicht und die Einverleibung des markierten Methionins in die subzellulären Kompartimente der Leber während fünf Tagen verfolgt. Die Leberfibrose wird von einem Anwachsen des Eiweissgehaltes und der Hialoplasma + Mikrosom-Fraktion der Leber begleitet. Die Einverleibung der markierten Aminosäure ist bei allen Fraktionen gering, sowohl im Vergleich zur Kontrolle als auch zu den Versuchsgruppen mit akuter Vergiftung. Die Verminderung des Einschlusses der Aminosäure in die Mitochondrien äussert sich auch durch die verspätete Erreichung des Kurvenmaximums — erst nach 24 Stunden (2 Stunden bei der Kontrollgruppe). Es werden auch verschiedene Unterschiede in der Zirkulation der Radioaktivität zwischen den Kernen und den Mitochondrien, respektive zwischen den Kernen und dem Überstand beobachtet, deren Bedeutung besprochen wird.

ST. CERC. BIOCHIM., 11, 1, P. 39–47 (1968)

CONTRIBUȚII LA BIOSINTEZA CAROTINOIDELOR

1. BIOGENEZA CAROTINOIDELOR DIN *ASTRAGALUS PETERFII* JAV. ȘI *ADONIS AESTIVALIS* L.

GAVRIL NEAMȚU și CORNEL BODEA

Rezumat. — S-au determinat pigmenții carotinoidici din semințe, frunze, muguri florali și flori din speciile *Astragalus peterfii* și *Adonis aestivalis*. Pe baza pigmenților găsiți și a interconversiunii carotinoidelor se propun unele scheme privind biosinteza carotinoidelor la speciile menționate. Din rezultatele obținute reiese că biosinteza carotinoidelor florale începe în mugurii florali nedezvoltați. La nivelul mugurilor florali pot avea loc atît procese de transformare a unor carotinoide foliare în cartinoide florale, cît și sinteza unor pigmenți carotinoidici florali din alți precursori.

Cunoașterea biosintezei pigmenților carotinoidici constituie o problemă de mare însemnătate teoretică și practică, fapt pentru care numeroși cercetători caută să-și aducă contribuția la cunoașterea formării *in vivo* a acestor pigmenți [1], [7], [8], [11], [19], [20].

Din cercetările efectuate pînă în prezent se cunoaște că biosinteza carotinoidelor poate fi realizată numai de organismele vegetale, atît clorofiliene cît și neclorofiliene [4]. Animalele nu pot sintetiza *de novo* pigmenții carotinoidici [22].

Primele cercetări privind biosinteza carotinoidelor s-au făcut pe organisme neclorofiliene, cum sînt ciupercile [28], bacteriile nefotosintetizante [14], unde lipsa fotosintezei ușurează observarea proceselor biogenetice. Ciupercile au fost mai frecvent utilizate în aceste cercetări, deoarece sînt reproductibile și ușor de cultivat și produc adesea un singur carotinoid esențial. La organismele clorofiliene, studiul carotenogenezei s-a făcut inițial pe alge verzi [3], iar la fanerogame pe plantule etiolate [26] și pe cloroplaste foliare [6], [7], [21].

Un pas însemnat în cunoașterea biogenezei carotinoidelor s-a realizat prin utilizarea izotopilor radioactivi, cu ajutorul cărora s-au putut stabili precursorii acestor pigmenți, precum și interconversiunea carotinoidelor [9], [10], [18], [23], [24].

Una dintre problemele importante, puțin cercetată pînă în prezent, este aceea a formării carotinoidelor florale. Majoritatea cercetărilor privind biogeneza carotinoidelor la anthofite s-au efectuat pe frunze și cloroplaste izolate, cultivate în soluții nutritive [5], [6], [7], [21], [26]. Întrucît la majoritatea plantelor există o deosebire mare între pigmenții carotinoidici

din frunze și cei din flori, am căutat să aducem unele contribuții privind locul de biogeneză a carotinoidelor florale la *Astragalus peterfii* și *Adonis aestivalis*.

MATERIAL ȘI METODE

S-a lucrat cu material proaspăt recoltat la diferite intervale de timp în perioada 1. IV—15. VI. 1966. Specia *Astragalus peterfii* a fost recoltată din rezervația naturală a comunei Suatu reg. Cluj, iar *Adonis aestivalis* de pe ferma didactică a Institutului Agronomic „Dr. P. Groza" din Cluj.

Pentru analiză s-au folosit 2 g semințe, 250 g frunze și muguri florali nedezvoltați și cîte 500 g flori și muguri florali dezvoltați. Pentru separarea și identificarea pigmenților carotinoidici ne-am folosit de metode cromatografice pe coloană și în strat subțire.

Materialul vegetal (semințe, frunze, muguri florali și flori) s-a mărunțit prin triturare cu sticlă pisată și nisip. Extragerea pigmenților s-a făcut cu un amestec de eter de petrol-acetonă-metanol în proporție de 7 : 2 : 1. Operația se repetă pînă ce reziduul rămîne incolor. Extractele de pigmenți, unificate, se spală cu apă distilată (25-30 de spălări în pîlnia de separare), pentru îndepărtarea acetonei și a metanolului. După spălare extractul se trece printr-un strat de Na_2SO_4 anhidru pentru îndepărtarea completă a apei și apoi se cromatografiază pe coloană (30 × 3 cm) cu amestec adsorbant format din oxid de magneziu și nisip fin, în proporție de 1 : 2 în greutate.

Coloana se developează cu amestec de eter de petrol-benzen-acetonă în proporție de 80 :18 :2. Pentru purificare pigmenții se separă mecanic, se eluează cu amestec de eter de petrol etanol 15 :2, se spală, se usucă și se recromatografiază [17],[18].

Pentru analiza carotinoidelor din semințe, frunze și muguri nedezvoltați ne-am folosit și de cromatografia în strat subțire, monodimensională, folosind plăci de sticlă (30 × 5 cm) acoperite cu un strat uniform de oxid de magneziu (terci, Union Chimique Belge S. D.). Irigarea plăcilor s-a făcut cu eter de petrol-benzen-propanol 95 :3 :2, timp de 2 ore. După irigare se stabilește valoarea Rf-ului și se trece la identificarea și determinarea carotinoidelor.

Identificarea pigmenților s-a făcut după poziția lor în coloana adsorbantă sau valoarea Rf-ului, culoare, repartiția epi- sau hipofazică în hexan-metanol 95%, după spectrele de absorbție în vizibil, ultraviolet și infraroșu. Ne-am folosit și de cromatograme de amestec cu pigmenți autentici, extrași din alte plante.

Epoxizii au fost identificați și prin reacția de culoare cu acidul clorhidric în soluție de eter etilic [15].

Dozarea carotinoidelor s-a făcut colorimetric, folosind o soluție standard de azobenzen [16].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

a) Biosinteza pigmenților carotinoidici din florile de Astragalus peterfii

În semințele de *Astragalus peterfii* s-a pus în evidență numai luteina, în cantitate foarte mică, de 0,004 mg/100 g material.

În frunzele recoltate la diferite intervale de timp s-au identificat carotinoide comune, ale căror determinări cantitative sînt trecute în tabela 1.

Nu s-au identificat carotinoide cu structură pseudoiononică, ce se găsesc în flori. Sub aspect cantitativ, o ușoară scădere a carotinoidelor

Tabela 1

Determinarea carotinoidelor foliare din *Astragalus peterfii* în mg/100 g frunze proaspete

Carotinoide \ Data recoltării	2.IV.1966	17.IV.1966	24.IV.1966	2.V.1966
β-carotină	1,50	1,40	1,25	1,10
criptoxantină	0,30	0,20	0,15	0,10
luteină	2,00	2,00	1,80	1,60
violaxantină	0,45	0,40	0,35	0,30
neoxantină	0,30	0,25	0,25	0,20
total carotinoide	4,55	4,25	3,80	3,30

se produce o dată cu îmbătrînirea frunzelor. O micşorare mai accentuată se observă în perioada formării şi dezvoltării mugurilor florali (24.IV—2.V). Xantofilele nu se găsesc sub formă de esteri, ci numai sub formă liberă. Pigmenţii principali din frunze sînt cei obişnuiţi : luteina şi β-carotina.

O comportare mai interesantă sub aspectul pigmenţilor carotinoidici o au mugurii florali în diferite faze de creştere. Determinările cantitative din mugurii florali şi din flori sînt trecute în tabela 2.

Tabela 2

Determinarea carotinoidelor din mugurii florali şi din flori de *Astragalus peterfii* în mg/100 g material proaspăt

Carotinoide	Muguri nedezvoltaţi 24.IV.1966	Muguri dezvoltaţi 2.V.1966	Flori proaspete 10.V.1966	Flori veştede 10.VI.1966
α-carotina	urme	0,10	0,169	—
β-carotina	1,40	1,20	1,07	0,40
γ-carotina	0,02	0,04	0,06	—
criptoxantină (ester)	0,80	1,40	1,68	1,30
luteină (ester)	0,50	1,30	1,85	1,60
zeaxantină (ester)	0,80	0,10	0,21	0,20
rubixantină (ester)	1,00	3,20	4,50	3,60
licopină	urme	0,06	0,10	—
criptoxantină	0,50	0,30	urme	—
luteină	1,60	0,50	0,32	0,30
zeaxantină	urme	0,10	0,15	—
violaxantină	0,60	urme	—	—
neoxantină	0,20	—	—	—

Din datele prezentate în această tabelă reiese că în mugurii florali nedezvoltaţi s-au pus în evidenţă atît carotinoidele care se găsesc în frunze (β-carotina, criptoxantina, luteina, violaxantina şi neoxantina), cît şi principalele carotinoide din flori (rubixantina ester, luteina ester, criptoxantina ester, zeaxantina ester, γ-carotina şi chiar urme de licopină).

În timpul creşterii mugurilor, carotinoidele foliare scad treptat, astfel încît unele, ca violaxantina şi neoxantina, nici nu apar în florile proaspete. Concomitent cu scăderea carotinoidelor foliare se produce o creştere a carotinoidelor florale, atît principale cît şi secundare. În general, o dată cu dezvoltarea mugurilor florali se produce o creştere a xantofilelor

esterificate și o scădere a xantofilelor libere. În florile proaspete, carotinoidele florale se găsesc în cantitatea cea mai mare, iar în timpul veștejirii florilor se produce o degradare treptată a pigmenților carotinoidici. Într-o proporție mai mare se distrug carotinoidele hidrocarburice și xantofilele libere, și mai puțin xantofilele sub formă de esteri.

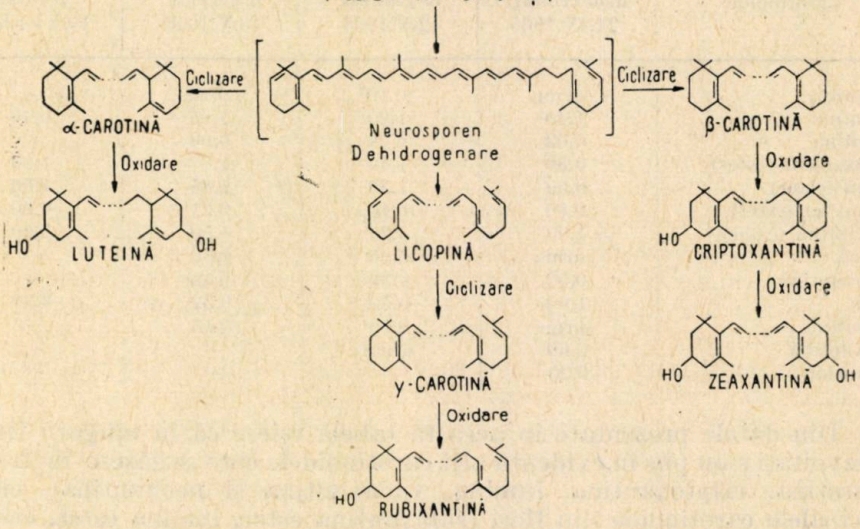
Întrucît în mugurii florali apare un număr însemnat de carotinoide ce nu se găsesc în frunze, dar care sînt prezente în flori, considerăm că mugurele floral este sediul biogenezei carotinoidelor florale.

La nivelul mugurelui floral pot avea loc atît procese biochimice de transformare a unor carotinoide foliare în carotinoide florale, cît și sinteza unor pigmenți florali din alți precursori.

Faptul că unele carotinoide din frunze pot contribui la formarea unor carotinoide din flori se poate deduce și din datele experimentale prezentate în tabela 1, din care reiese că pigmenții carotinoidici foliari scad mai mult sub aspect cantitativ în perioada formării și dezvoltării mugurilor florali (24.IV—2 V.1966). Cantitatea de carotinoide din mugurii florali (100 g material) este cu mult mai mare decît în frunze, ceea ce arată că o parte din carotinoidele florale au o altă cale de biosinteză. Pigmenții carotinoidici din semințe și din frunze nu pot deci constitui singurele surse de formare a carotinoidelor florale.

Pe baza pigmenților identificați în semințe, frunze, muguri florali și flori, a dinamicii acestor pigmenți și ținînd seama de interconversiunea carotinoidelor, propunem următoarea schemă de biogeneză a carotinoidelor

SCHEMA BIOSINTEZEI CAROTINOIDELOR DIN FLORILE DE *ASTRAGALUS PETERFII*



Schema nr. 1

în florile de *Astragalus peterfii* (schema nr. 1). Pigmenții care nu sînt în paranteze au fost identificați de noi, iar cei din paranteze se presupun a fi etape intermediare în procesele de biogeneză.

Din schemă se observă că neurosporenul poate să îndeplinească un rol însemnat în procesul de biosinteză a carotinoidelor aciclice și ciclice.

Astfel din neurosporen, prin dehidrogenare, se poate forma licopina, iar prin ciclizarea acesteia la un capăt, γ-carotina, din care, prin oxidare, ia naştere rubixantina.

Dehidrogenarea şi ciclizarea neurosporenului la ambele capete, prin eliminarea unui proton de la carbonii C_6 şi C_6' duce la formarea β-carotinei [12], care prin oxidare poate să formeze criptoxantina şi zeaxantina.

Prin eliminarea protonilor de la carbonii C_6 şi C_4' se formează α-carotina [13], iar prin oxidare luteina.

b) Biosinteza pigmenţilor carotinoidici din florile de Adonis aestivalis

În seminţele de *Adonis aestivalis* s-a identificat de asemenea numai luteina, în cantitate mică, iar în frunze carotinoide comune, a căror determinare cantitativă este trecută în tabela 3.

Tabela 3

Determinarea cantitativă a carotinoidelor din frunze de *Adonis aestivalis* în mg/100g material proaspăt

Carotinoide \ Data recoltării	5.IV.1966	15.IV.1966	30.IV.1966	15.V.1966
β-carotina	1,60	1,40	1,30	1,10
luteina	2,00	1,80	1,50	1,40
violaxantina	0,55	0,45	0,40	0,30
neoxantina	0,25	0,20	0,20	0,20
total carotinoide	4,40	3,85	3,40	3,00

Din determinarea carotinoidelor foliare reiese că cantitatea de violaxantină şi neoxantină scade mai puţin o dată cu îmbătrînirea frunzelor. Variaţii mai mari suferă pigmenţii principali : β-carotina şi luteina.

În mugurii florali şi flori s-au găsit un număr mai mare de carotinoide ce aparţin în general sistemului β-iononic (tabela 4).

În mugurii florali nedezvoltaţi apar şi în cazul acestei specii carotinoide foliare ca β-carotina, luteina, violaxantina, neoxantina, precum şi principalele carotinoide din flori — astaxantina ester şi hidroxi-echinenona.

La *Adonis aestivalis* se observă de asemenea foarte bine cum, o dată cu creşterea mugurilor florali, se micşorează treptat carotinoidele foliare, astfel încît în flori apare numai β-carotina. Concomitent cu scăderea carotinoidelor foliare se produce o creştere a carotinoidelor florale principale, precum şi apariţia carotinoidelor secundare, ca dihidroxi-β-carotina, adonixantina, adonirubina şi tetrahidroxi-β-carotina.

Prezenţa pigmentului principal din flori — astaxantina ester — în mugurii nedezvoltaţi, precum şi lipsa acestui pigment în frunze sînt o nouă dovadă că biosinteza carotinoidelor florale începe în mugurii florali.

La această specie propunem o schemă de biogeneză a carotinoidelor din florile de *Adonis aestivalis* (schema nr. 2).

Din schemă se observă mecanismul prin care principalele carotenoide din frunze se pot transforma în carotinoide florale prin intermediul 3—4 dihidroxi-β-carotinei.

Dihidroxi-β-carotina, pigment nou descoperit de noi [18], se poate forma din principalele carotinoide foliare, ca β-carotina, luteina şi vio-

Tabela 4

Determinarea carotinoidelor din muguri florali și flori de *Adonis aestivalis* (mg/100 g material proaspăt)

Carotinoide	Muguri nedezvoltați — 20.IV. 1966	Muguri slab dezvoltați 25.IV. 1966	Muguri dezvoltați 30.IV. 1966	Muguri deschiși 5.IV.1966	Flori proaspete 11.V.1966	Flori veștede 15.VI. 1966
β-carotină	2,00	1,80	1,65	1,50	1,40	1,00
luteină	0,80	0,50	0,30	0,20	—	—
violaxantină	0,40	0,30	0,25	0,25	—	—
neoxantină	0,20	0,15	0,10	—	—	—
dihidroxi-β-carotină (trans-total)	urme	0,20	0,40	0,65	0,88	0,60
dihidroxi-β-carotină (cis-trans)	urme	urme	0,15	0,20	0,33	0,25
hidroxiechinenona	0,01	0,60	1,00	1,30	1,80	1,40
adonixantină	—	urme	0,10	0,70	1,00	0,80
adonirubină	—	urme	0,20	0,60	1,20	0,90
tetrahidroxi-β-carotina	urme	0,01	0,08	0,10	0,14	0,10
astaxantină (cis-trans)	0,20	0,80	1,30	2,70	3,64	2,50
astaxantină (trans-total)	1,20	8,00	12,00	18,00	25,15	15,00
astacină	—	urme	0,05	0,80	2,11	3,00

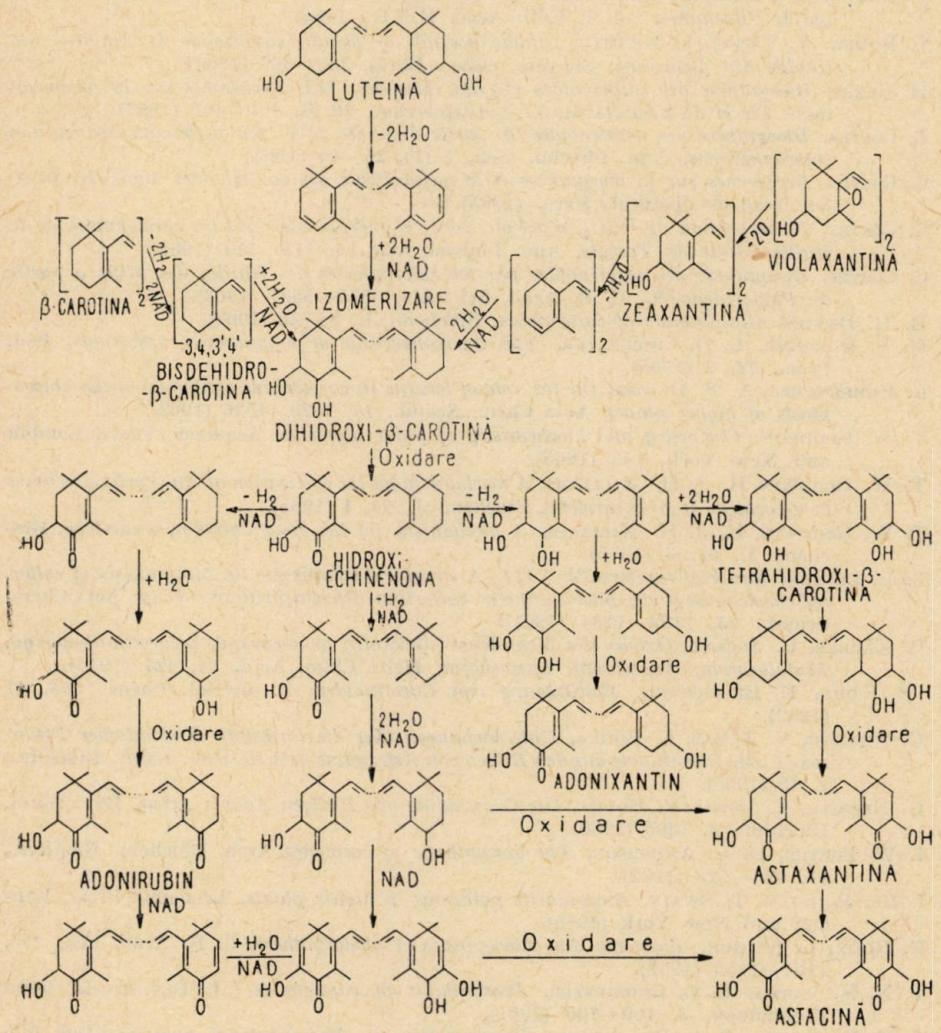
laxantina, prin reacții de dehidrogenare sau dehidratare. În toate cazurile se poate ajunge intermediar la 3, 4, 3′, 4′-bisdehidro-ß-carotina, care prin hidroxilare să formeze noua xantofilă.

3, 4, 3′, 4′-bisdehidro-β-carotina nu a putut fi identificată în natură, deoarece este o dehidro-carotinoidă foarte activă din punct de vedere chimic și nestabilă. Noi am preparat-o în laborator prin acțiunea undecaclorfenotiazinei asupra β-carotinei [2].

Din dihidroxi-β-carotină, prin oxidarea oxidrilului alilic, se poate forma hidroxi-echinenona, principala carotinoidă secundară din florile acestei plante. În natură, aceasta este una din căile principale de formare a ceto-carotinoidelor din hidroxi-carotinoide.

Din hidroxi-echinenonă, prin reacții de oxido-reducere, se pot forma un număr mai mare de ceto-hidroxi-carotinoide secundare, dintre care am identificat pînă în prezent adonirubinul, adonixantinul și tetrahidroxi-β-carotina, ce are un rol important în formarea astaxantinei. Astaxantina se transformă foarte ușor, prin oxidare, în astacină. Acest proces se petrece chiar în timpul cromatografiei, iar cantitativ în timpul saponificării la aer.

SCHEMA BIOSINTEZEI CAROTINOIDELOR ÎN FLORILE DE *ADONIS AESTIVALIS*



Schema nr. 2

CONCLUZII

Din rezultatele obținute reiese că biosinteza carotinoidelor florale începe în mugurii florali. La nivelul mugurilor florali pot avea loc atît procese de transformare a carotinoidelor foliare în carotinoide florale, cît și sinteza unor pigmenți carotinoidici florali din alți precursori.

Pe baza pigmenților carotinoidici identificați și ținînd seama de interconversiunea carotinoidelor, am propus unele scheme originale privind biosinteza carotinoidelor în florile de *Astragalus peterfii* și *Adonis aestivalis*.

Prezentat la redacție la 12 iulie 1967

Catedra de biochimie
Institutul Agronomic „Dr. P. Groza"
Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. C. Bodea, V. Fărcășan, E. Nicoară, H. Sluşanschi, *Tratat de biochimie vegetală*, Partea I, *Fitochimie*, vol. 1, Edit. Acad. R.P.R., 1964.
2. C. Bodea, V. Tămaş, G. Neamţu, *Sinteze parţiale de dehidro-carotinoide I. Dehidro-carotinoide din β-carotine*, St. cerc. chim., **12** (5), 365—369 (1964).
3. H. Claes, *Biosynthèse des caroténoïdes par les chlorelles. III. Recherches sur la photosynthèse d'α et de β-carotènes*, Z. Naturforschg., **12**, B, 401—407 (1957).
4. C. Costes, *Biosynthèse des caroténoïdes à partir d'acétate 2-^{14}C par différents organes non chlorophylliens*, Ann. Physiol. vég., *7* (1), 25—40 (1965).
5. C. Costes, *Recherches sur la biosynthèse et le métabolisme des caroténoïdes dans les feuilles*, Teză de doctorat, Paris (1965).
6. C. Costes, *Incorporation de $^{14}CO_2$, d'acétate 2-^{14}C et mévalonate dans les caroténoïdes de la feuille adulte de Tomate*, Ann. Physiol. vég., *5*, 115—140 (1963).
7. C. Costes, *Biosynthèse des caroténoïdes par les chloroplastes des feuilles des Maïs a partir de Phytofluene-^{14}C*, C. R. Acad. Sci., *256*, 3535—3537 (1963).
8. B. H. Davies, *Biosynthesis of carotenoids*, Biochem. J., *85*, 28 (1962).
9. H. V. Donohne, C. O. Chichester, *The interconversion of oxygenated carotenoids*, Fed. Proc., *24*, 2 (1965).
10. L. Eurelnberg, A. F. Daniel, *On the role of leucine in carotenoids synthesis of the chloroplasts of higher plants*, Acta Chem. Scand., *16*, 1523—1526 (1962).
11. T. W. Goodwin, *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, Academic Press, London and New York, 143 (1965).
12. T. W. Goodwin, R. J. H. Williams, *A mechanism for the cyclization of an acyclic precursor to α-carotene from β-carotene*, Biochem. J., *94*, 1 (1965).
13. T. W. Goodwin, R. J. H. Williams, *A mechanism for the biosynthesis of α-carotene*, Biochem. J., *97*, 3 (1965).
14. S. L. Lensen, *Bacterial carotenoids. VIII. A structural scheme for the biosynthesis of coloured carotenoids in the photosynthetic bacterium Rhodospirillum rubrum*, Acta Chem. Scand., *25*, 1182—1184 (1961).
15. P. Karrer, E. Jucker, *Oxydes des β-caroténes*; *β-carotin monoepoxyd*, *β-carotin-di-epoxyd*, *Mutatochrom*, *Aurochrom*, *Luteochorm*, Helv. Chim. Acta, *28*, 427 (1945).
16. R. Kuhn, H. Brockmann, *Bestimmung von Carotinoiden*, Z. physiol. Chem., *206*, 41 (1932).
17. G. Neamţu, V. Tămaş, C. Bodea, *Untersuchungen über die Farhstoffe Endemischer Pflanzen. I. Die Carotinoide aus den Blüten von Astragalus peterfii*, Rev. roum. Biochim., *2*, 45 (1965).
18. G. Neamţu, V. Tămaş, C. Bodea, *Die Carotinoide aus Einigen Adonis Arten*, Rev. roum. Biochim., *3*, 1305 (1966).
19. I. W. Porter, D. G. Anderson, *The biosynthesis of carotenes*, Arch. Biochem. Biophys., *97*, 520—528 (1962).
20. I. Br. Pridham, T. Swain, *Biosynthetic pathways in higher plants*, Academic Press, London and New York (1965).
21. E. Roux, C. Husson, *Pigments des chloroplastes et photosynthèse*, C. R. Acad. Sci., *235*, 1154—1155 (1952).
22. T. N. R. Varma, C. O. Chichester, *Biosynthesis of carotenoids*, J. Reviews in Food Technology, *3*, 109—130 (1961).
23. T. N. R. Varma, C. O. Chichester, *Incorporation of Δ^3-isopentenyl pyrophosphate into lycopene in tomato homogenate*, Arch. Biochem. Biophys., *96*, 265—269 (1962).
24. T. N. R. Varma, C. O. Chichester, *Incorporation of citral-C^{14} and geraniol-C^{14} into β-carotene in Carrot Root Silices*; *Interconversion of citral and geraniol in Carrot Roor Silices and by alcohol dehydrogenase*, Arch. Biochem. Biophys., *96*, 419—422 (1962).
25. T. N. R. Varma, C. O. Chichester, *Incorporation of Δ^3-isopentenyl pyrophosphate into lycopene in tomato homogenate*, Arch. Biochem. Biophys., *96*, 265—269 (1962).
26. F. T. Wolf, *Effects of light and darkness in biosynthesis of carotenoid pigments in wheat seedling*, Plant Physiology, *38*, 6 (1963).
27. H. Yamamoto, H. Yokojama, K. Simpson, T. O. M. Nakayama, C. O. Chichester, *Incorporation of 5, 10, 15-^{14}C-farnesol pyrophosphate into Phycomyces carotenoids*, Nature, *191*, 1298—1300 (1961).
28. H. Yokoyama, T. O. M. Nakayama, C. O. Chichester, *Biosynthesis of β-carotene by cell free-extracts of Phycomyces blakesleanus*, J. Biol. Chem., *237*, 681 (1962).

CONTRIBUTIONS À LA BIOSYNTHÈSE DES CAROTINOÏDES

I. LA BIOSYNTHÈSE DES CAROTINOÏDES DE *ASTRAGALUS PETERFII* JAV. et *ADONIS AESTIVALIS L.*

RÉSUMÉ

On a déterminé les pigments carotinoïdes de semences, feuilles, bourgeons floraux, fleurs des espèces *Astragalus peterfii* et *Adonis aestivalis*. En considérant les pigments déterminés et l'interconversion des carotinoïdes on propose certaines schémas concernant la biosynthèse des carotinoïdes chez les espèces mentionnées. Les résultats obtenus montrent que la biosynthèse des carotinoïdes florales commence dans les bourgeons floraux nondéveloppés. Au niveau des bourgeons floraux peuvent avoir lieu les processus de transformation de certaines carotinoïdes foliaires en carotinoïdes florales, ainsi que la synthèse de certains pigments carotinoïdiques floraux provenant d'autres précurseurs.

ST. CERC. BIOCHIM., II, 1, 49–55 (1968)

DETERMINAREA CANTITATIVĂ A COMPUŞILOR IODAŢI ÎN ŢESUTUL TIROIDIAN

(Studiu cu ^{131}I)

I. NEGOESCU, A. CONSTANTINESCU şi A. DIMITRIU

Rezumat. — Se indică o metodă de determinare cantitativă a compuşilor iodaţi din ţesutul tiroidian, bazată pe hidroliza enzimatică a fragmentelor de ţesut, urmată de determinări radiocromatografice.

Prin detalii de tehnică s-a obţinut o pecizie corespunzătoare, o scurtare a duratei de lucru şi o reducere a manoperei faţă de alte tehnici cunoscute în prezent în literatură.

Rezultatele obţinute în determinări paralele, utilizînd această metodă şi aceea a lui V. Galton şi Pitt-Rivers (în care separarea se face pe schimbători de ioni), nu diferă semnificativ.

Încă din anul 1938 se ştie că glanda tiroidă are drept funcţie esenţială sinteza, depozitarea şi eliberarea hormonilor iodaţi specifici. Problemele în legătură cu separarea şi metabolismul hormonilor tiroidieni n-au putut totuşi progresa decît în ultimii 15 ani, cînd asocierea metodei cromatografice cu metode radiochimice a făcut posibilă nu numai urmărirea hormonilor tiroidieni la periferie, în circulaţia sanguină, ci şi în însuşi corpul tiroidian, sediul hormonogenezei. Dacă în sînge tiroxina (T_4) reprezintă constituentul iodat major, în ţesutul tiroidian repartiţia iodului este inegală, diversitatea produşilor mai mare, iar dinamica transformărilor mai rapidă.

Punerea în evidenţă a produşilor iodaţi din ţesutul tiroidian (hormoni tiroidieni, metaboliţi sau predecesori ai acestora) şi determinarea variaţiilor lor cantitative reprezintă o problemă importantă în studiul biochimiei tiroidiene; de aceea ne-am propus să stabilim o metodă de lucru în care, ţinînd seama de rezultatele obţinute pînă în prezent de diverşi cercetători, să aducem noi precizări de tehnică în vederea reducerii duratei de lucru.

Metodele citate în literatură şi luate în consideraţie în acest studiu au fost : metoda G. Meyniel [1], V. A. Galton [2], J. Roche [3] şi L. Lowson [4].

În principiu, aceste metode prevăd hidroliza iodoproteinelor tiroidiene cu diferite enzime proteolitice şi apoi separarea produşilor obţinuţi prin cromatografiere pe hîrtie, cu sau fără trecerea prealabilă pe răşină schimbătoare de ioni.

MATERIAL ŞI METODE

Condiţiile preliminare prelevării fragmentelor de ţesut tiroidian au fost următoarele :

— se administrează pacienţilor 500μCi — 1 mCi ^{131}I, sub formă de INa ;

— după 24 de ore de la administrea ^{131}I se face tiroidectomia şi prelevarea fragmentelor de ţesut.

Tehnica folosită de noi prezintă următoarele etape, pe care le redăm pe scurt :

a. *Omogenizarea ţesutului.* După prelevarea fragmentelor de ţesut tiroidian, acestea sînt imediat triturate bine cu zăpadă carbonică şi nisip de cuarţ (numai în cazul fragmentelor mai dure), pînă la completa pastificare.

Cantitatea de ţesut luată în lucru a variat între 1 şi 2 g, în funcţie de activitatea specifică determinată în prealabil şi care, la rîndul ei, depinde de posibilităţile de fixare a iodului de către subiecţii luaţi în studiu.

b. *Hidroliza iodoproteinelor tiroidiene* se face cu pronază, iar în lipsa acesteia cu pancreatină [4].

Tamponul folosit la hidroliză, preparat extemporaneu şi răcit la gheaţă, a fost tris-(hidroxi-metil) amino-metan 0,04 M, NaCl 0,11 M [4].

În mediul de hidroliză se adaugă metiltiouracil 0,04% [6], ca inhibitor al degradării ulterioare a compuşilor iodaţi, şi sulfat de mangan 0,04 M, care ar ameliora randamentul reacţiei enzimatice [7].

La începutul hidrolizei se aduce pH-ul la 8,6 cu HCl 0,1 N, iar în timpul hidrolizei se verifică şi, eventual, se ajustează la aceeaşi valoare.

Drept conservant se adaugă toluen [8]. Timpul de hidroliză la 37°C este de 24 de ore [7].

c. *Separarea compuşilor iodaţi apăruţi în urma hidrolizei*

După hidroliză se face determinarea radioactivităţii supernatantului, apoi proba este supusă cromatografierii. Dacă activitatea în supernatant este suficient de mare, astfel încît la 0,05—0,1 ml să se obţină 15 000—20 000 impulsuri pe minut, cantitatea respectivă se centrifughează şi apoi se trece la separarea cromatografică. Cînd activitatea este prea mică, se face o triplă extracţie butanolică, supunîndu-se cromatografierii reziduul sec, redizolvat.

Depunerea spoturilor se face linear, pe hîrtie cromatografică Whatman 3, după ce probelor li s-au adăugat purtători.

Pentru cromatografia monodimensională s-au folosit ca solvenţi de migrare :

I. Bu(OH)/Et.(OH)/NH_4OH 2N (5 :1 :2 v/v) 18—20 h

II. Bu(OH)/dioxan/NH_4OH 2N (4 :1 :5) la 35°C

III. Collidină/NH_4 OH 3N (3 :1)

IV. Bu(OH)/acid acetic/apă (4 :1 :5).

Pentru cromatogramele bidimensionale se pot folosi două sisteme :

I *a*) Alcool amilic III/NH_4OH/apă (prima dimensiune)

b) Bu(OH)/acid acetic/apă (a doua dimensiune)

II *a*) Bu(OH)/dioxan/NH_4OH

b) Bu(OH)/acid acetic/apă

d. *Determinarea cantitativă a repartiţiei produşilor iodaţi în hidrolizatul tiroidian.*

Probele supuse cromatografierii sînt măsurate după uscare. La cromatogramele monodimensiomale se fac măsurări pe fişii decupate cu lăţimea 1 cm. Identificarea iodocompuşilor se face prin determinarea valorii Rf a produşilor stabili folosiţi drept etaloane pe fiecare bandă cromatografică şi coloraţi cu reactivul specific de colorare : $Ce(SO_4)_2$ 10% : As_2O_3 5% în proporţie de 1/1 (9). Accentuarea spoturilor se face prin colorare suplimentară cu o-fenilen-diamină [10].

Măsurarea activității se face cu ajutorul unui contor de scintilație cu puț, pentru radiații γ, avînd grijă să se păstreze geometria de măsurare. În funcție de reactivitățile măsurate se stabilește repartiția procentuală a diferiților compuși iodați.

În cazul cromatogramei bidimensionale, punerea în evidență a spoturilor se face prin autoradiografie [11]. Aprecierea semicantitativă a rezultatelor se face prin planimetrare și determinare densitometrică a gradului de impresionare a filmului.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Reproductibilitatea s-a cercetat prin analizarea în 4 repetiții a unui hidrolizat tiroidian, repartiția activității pe produșii iodați fiind redată în tabela 1.

Tabela 1

Repartiția procentuală a activității corespunzătoare diferiților compuși iodați dintr-un hidrolizat tiroidian pe hîrtia cromatografică

Compusul iodat	Repetiții				Media % ± ES
	I	II	III	IV	
Start	2,8	3,0	2,5	2,8	2,8±0,10
MIT	51,9	50,8	52,0	49,9	51,1±0,77
DIT	19,7	20,3	17,9	17,6	18,8±0,98
I^-	11,7	12,4	13,0	14,8	12,9±0,67
T_3	2,0	1,4	1,8	2,0	1,8±0,10
T_4	11,9	12,1	12,8	12,9	12,4±0,31

MIT = monoiodotirozină T_3 = triiodotironină
DIT = diiodotirozină T_4 = tiroxină
I^- = iod anorganic Valorile numerice reprezintă procente de radioactivitate.

Determinarea pierderilor de activitate în cursul diverselor manopere este prezentată în tabela 2.

Tabela 2

Pierderile din activitatea țesutului tiroidian în timpul determinării experimentale

Activitatea țesutului tiroidian la recoltare	100%
Pierderi din activitate prin triturare,	
— pastificare, hidroliză	0,8% (hidroliză cu pancreatină)
Alte pierderi pînă la cromatografiere	3,2% (ambele hidrolize)
Pierderi din activitate la cromatografiere,	
— monodimensională	3,2%
— bidimensională	6,6%
Regăsirea activității	
— pe cromatograme monodimensionale	92,8% (hidroliză cu pancreatină)
	88,5% (hidroliză cu tripsină)
— pe cromatograme bidimensionale	89,4% (hidroliză cu pancreatină)
	84,1% (hidroliză cu tripsină)

Pentru determinarea regăsirii tiroxinei și iodurilor, s-au adăugat la probe paralele cantități cunoscute de tiroxină marcată cu ^{131}I, ca $Na^{131}I$, urmîndu-se toate treptele metodei.

Regăsirea tiroxinei adăugate la ţesutul tiroidian a variat, la 10 probe lucrate în paralel, între 82 şi 97 %, cu o eroare standard de ±4,1 %, iar regăsirea iodurii a fost de 90,5 %, cu o eroare standard de ± 3,4 %. Aceste rezultate au dus la concluzia excluderii triplei extracţii amoniacale recomandate de J. Roche [11], urmată de centrifugări, întrucît s-ar fi prelungit manopera, fără a mări procentul de recuperare a tiroxinei şi iodurii.

În timpul hidrolizei s-a constatat că pH-ul era mai stabil în cazul folosirii tamponului *tris*, care, de aceea, a fost preferat tamponului borat (pH 8,6), indicat de Galton [12].

Hidroliza s-a obţinut în condiţii mai bune cu pronază sau cu pancreatină. Hidroliza triptică [2] are un randament enzimatic inferior, necesitînd în acelaşi timp o perioadă de hidroliză mai mare (36 h faţă de 24 h).

În tabela 3 se redau valorile procentuale ale startului cromatogramei (Bu(OH)/Et.(OH)/NH_4OH) unui hidrolizat obţinut cu pancreatină şi cu tripsină.

Tabela 3

Valorile procentuale ale activităţii produşilor iodaţi, înregistrate pe stratul cromatogramei în urma hidrolizei cu pancreatină şi tripsină (după migrare)

Hidroliză cu pancreatină	Hidroliză cu tripsină
0,43	3,82
0,45	2,66
0,49	4,02
0,27	5,45
0,82	3,96
Media±ES 0,49±0,028	3,98±0,44

Din 6 determinări comparative cu privire la necesitatea folosirii drept conservant a toluolului sau streptomicinei s-a ajuns la concluzia că mai indicată este folosirea primului reactiv.

Metoda pusă la punct şi descrisă de noi a fost comparată cu metoda Galton şi Pitt-Rivers [2], în care compuşii iodaţi din hidrolizatul tiroidian sînt separaţi şi purificaţi prin cromatografie pe coloană, folosind răşina Dowex 1(x)2, echilibrată cu tampon acetat; compuşii iodaţi sînt apoi eluaţi, la pH-uri diferite, cu tampon acid acetic — acetat de amoniu. Între rezultatele obţinute la aceleaşi probe, analizate prin cele două metode, nu s-au înregistrat variaţii semnificative.

Sistemele de solvenţi luate în studiu şi la care s-a determinat Rf-ul compuşilor iodaţi (comparativ cu cel indicat de literatură) sînt înscrise în tabela 4.

În cazul folosirii solvenţilor de migrare pe bază de butanol sau dioxan, din determinările paralele cu reactivii ca atare şi cu reactivi purificaţi prin redistilare a reieşit că prin redistilare se obţin rezultate mai corecte.

La fundamentarea datelor de tehnică s-au făcut experimentări folosind valori variabile pentru unii parametri: timp de migrare, temperatură, adaosul de metil-mercapto-imidazol 5% în solvent (8) etc. De

Tabela nr. 4

Valorile Rf ale principalilor compuşi iodaţi şi substanţe înrudite (după observaţiile noastre şi cele din literatură)

Compusul iodat	Solv. nr. 1		Solv. nr. 2		Solv. nr. 3		Solv. nr. 4		Solv. nr. 5		Solv. nr. 6	
	Exp.	(1′)	Exp.	(2′)	Exp.	(3′)	Exp.	(4′)	Exp.	(5′)	Exp.	(6′)
Tiroxină (T_4)	0,82	0,80	0,20	0,21	0,60	0,53	0,30	0,45	0,56	0,53	0,46	0,45
Triiodotironină (T_3)	0,77	0,68	0,40	0,40	0,71	0,70	0,52	0,65	0,65	0,64	0,58	0,65
Diiodotironină (T_2)	0,72	—	0,38	—	0,74	—	0,59	—	—	—	0,72	—
Diiodotirozină (DIT)	0,49	0,54	0,14	—	0,07	0,08	0,07	0,11	0,16	0,10	0,15	0,11
Monoiodotirozină (MIT)	0,36	0,41	0,12	—	0,10	0,13	0,11	0,17	0,20	0,12	0,24	0,28
Iod anorganic (I^-)	0,14	0,20	0,18	—	0,30	0,37	0,37	0,40	0,41	0,38	0,84	0,90
Tirozină (Tyr)	—	—	—	—	—	—	0,10	0,12	0,38	—	0,20	0,25
Triptofan (Rty)	—	—	—	—	—	—	—	—	0,44	0,44	—	—
Tironină (T)	—	—	—	—	—	—	—	—	0,48	0,50	—	—

Solv. nr. 1 : N Butanol/ac. acetic/apă (9 :1 :2,5)
Solv. nr. 2. : alc. amilic III/amoniac/apă (5 :1 :4)
Solv. nr. 3 : alc. Butanol sat. cu amoniac 2N
Solv. nr. 4 : N Butanol/dioxan/amoniac (4 : 1 : 5)
Solv. nr. 5 : N Butanol/etanol/amoniac (5 :1 :2)
Solv. nr. 6 : collidină/amoniac (3 :1)

(1′) : Roche J., Jutisz M., Lissitzkys Michel R., Biochem. Biophys. Acta, 7, 257 (1951).
(2′) : Roche J., Michel R., Johan P., Coll. on Endocr. *10*, 168 (1957).
(3′) : Roche J., Lissitzkys Michel R., Methods of biochemical Analysis 243 (1954).
(4′) : Gross J., Leblond C. P., Endocr. *48*, 717 (1951).
(5′) : Closon J., La sulfoconjugation de la triiodothyronine, 58 (1964).
(6′) : Gross J., Brit. Med. Bull. *10*, 218 (1954).

asemenea s-au făcut experimentări în paralel cu privire la hîrtia cromatografică folosită şi la modul de depunere a spotului.

Pe baza rezultatelor obţinute, care indică valori asemănătoare celor date pentru diversele categorii de cazuri clinice, s-au stabilit metoda şi tehnica de lucru descrise mai sus. În acest fel s-au adus îmbunătăţiri la tehnicile descrise anterior de diverşi cercetători, mărindu-se precizia determinării, reducîndu-se durata acesteia şi manopera de execuţie şi adaptînd metoda condiţiilor noastre de dotare.

CONCLUZII

Pentru determinarea cantitativă a compuşilor iodaţi din ţesutul tiroidian este necesară asocierea metodei cromatografice cu tehnici radiochimice şi biochimice.

Determinarea impune menţinerea cît mai constantă a unor condiţii preliminare prelevării fragmentelor de ţesut (doza de produs iodat radioactiv injectată, timpul de la injectarea produsului şi prelevarea fragmentelor de ţesut în urma tiroidectomiei etc).

Hidroliza ţesutului omogenizat se realizează în condiţii optime ca randament şi durată cu pronază sau pancreatină, folosindu-se tampon *tris*, pH 8,6, şi adăugîndu-se la mediul de hidroliză inhibitori de degradare, conservanţi şi amelioratori ai randamentului reacţiei enzimatice.

Separarea compuşilor iodaţi se face prin radiocromatografie mono- şi bidimensională, identificarea prin determinarea Rf-ului produşilor stabili folosiţi drept etaloane, iar determinarea cantitativă prin radiometrie cu contor de scintilaţie cu puţ sau prin planimetrarea şi determinarea densitometrică a gradului de impresionare a filmului.

Rezultatele obţinute prin aplicarea metodei descrise indică date care corespund valorilor citate în literatură pentru diversele categorii de cazuri clinice.

Prezentat la redacţie la 28 martie 1967

Institutul de endocrinologie al Academiei Republicii Socialiste România, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. G. Meyniel, P. Blanquet, J. Mounier, M. Estibotte, *Sur la séparation qualitative et quantitative des acides aminés iodés thyroïdiens par chromatographie sur résine échangeuse d'anions (Dowex)*, Bull. Soc. Chim. Biol., *40*, 369 (1958).
2. V. A. Galton, R. Pitt-Rivers, *Thyroid hormones metabolism in the kidney*, Biochem. J., *73*, 314—18 (1959).
3. J. Roche, R. Michel, J. Nunez, *Sur la présence des 3,3′-diiodothyronine et 3,3′, 5′-triiodothyronine dans la thyroglobuline de porc*, Bull. Soc. Chim. Biol., *40*, 361 (1958).
4. Lowson L. Rosenberg, M. R. Dimick, Gilles la Roche, *Thyroid function in chickens and rats*, Endocrinology, *72*, 749 (1963).
5. Richard A. Mandl, R. J. Block, *Methods for the qualitative, semiquantitative and quantitative determination of iodoaminoacids and of inorganic iodide in iodoprotein digests and in human serum*, Arch. Biochem. Biophys., *81*, 25—35 (1959).
6. V. Stolc, *Detection of the minute quantities of (T_4) in serum*, Nature, *182*, 52, (1958).

7. W. Tong, Chaikoff, *Hydrolysis of I^{131} thyroprotein by pancreatic enzymes*, J. biol. Chem., *232*, 939 (1958).
8. J. Roche, *Chromatographic analysis of radioactive iodine compounds from the thyroid gland and body fluids*, in *Methods of biochemical analysis*, vol. I (1954) 243.
9. C. H. Bowden, N. F. Maclagan, *The detection of (T_4) and related substances on paper chromatograms by the ceric sulphate arsenious acid reaction*, Biochem. J., *56*, VII (1954).
10. C. H. Bowden, N. F. Maclagan, J. H. Wilkinson, *The application of ceric sulphate arsenious acid reaction to the detection of thyroxine and related substances*, Biochem. J., *59*, 93 (1955).
11. J. Roche, R. Michel, *Analysis of natural radioactive iodine compounds by chromatographic and electrophoretic methods* in *Methods of biochemical analysis*, vol. XII (1964) 155.
12. V. A. Galton, R. Pitt-Rivers, *A quantitative method for the separation of thyroid hormones and related compounds from serum and tissues with an anion exchange resin*, Biochem. J., *72*, 310 (1959).

QUANTITATIVE DETERMINATION OF IODINATED COMPOUNDS IN THYROID TISSUE

(Study with ^{131}I)

SUMMARY

A method has been set up for quantitative determination of iodinated compounds. This is done by enzymatic hydrolysis of tissue fragments, followed by radiochromatographic measurements.

Under the conditions which are given in this work, a suitable precision, as well as a reduction of the time required by the experiments, were obtained. Also, this method is easier to perform than any others presently known.

The data obtained by our method were in good agreement with those of a series of homologous determinations using Galton and Pitt-Rivers method (in which the hydrolysis products are separated on ion exchangers).

ST. CERC. BIOCHIM., **11**, *1*, 57–60 (1968)

CAROTINOIDELE DIN FRUCTELE DE *SOLANUM LANCIFOLIUM* ŞI *CYPHOMANDRA BETACEA*

ELENA NICOARĂ, TAMARA SALONTAI şi CORNEL BODEA

Rezumat. — Fructele coapte, de culoare portocalie, ale ambelor solanacee cercetate, *Solanum lancifolium* şi *Cyphomandra betacea*, conţin ca pigmenţi principali β-carotina, criptoxantina şi zeaxantina, în cantităţi şi rapoarte diferite. Dintre carotinoidele cu structură α a fost identificată numai luteina, care scade pe măsură ce fructele se coc, în timp ce conţinutul total de carotinoide creşte.

Se ştie că numeroase solanacee se caracterizează printr-o carotenogeneză accentuată şi variată, încît specii foarte apropiate sau varietăţi ale aceleiaşi specii prezintă mari deosebiri calitative şi cantitative. De exemplu, fructele roşii de *Solanum lycopersicum* au ca pigment principal licopina, iar varietăţile galbene conţin foarte puţină licopină sau de loc, pigmenţii lor principali fiind β-carotina şi luteina [1]. Tot în cadrul acestei specii se cunosc varietăţi cu fructe roşii-portocalii, cu un conţinut ridicat în δ-carotină [2], carotinoidă rar întîlnită în natură.

Prin cercetarea carotinoidelor secundare din caliciile de *Physalis alkekengi*, specie aparţinînd şi ea solanaceelor, am reuşit să izolăm şi să caracterizăm o nouă xantofilă, 3′-hidroxi-α-carotina [3], [4]. Cholnoky şi colab. [5], cercetînd carotinoidele din fructele de *Capsicum anuum* var. *lycopersiciforme flavum*, izolează şi caracterizează acelaşi pigment, numindu-l α-criptoxantină.

Cercetarea carotinoidelor altor solanacee prezenta astfel interes atît pentru cunoaşterea răspîndirii hidroxi-α-carotinei, cît şi a altor pigmenţi mai rar întîlniţi în natură.

Pentru început, ne-am propus să cercetăm pigmenţii din fructele de culoare portocalie a două solanacee exotice : *Solanum lancifolium*, plantă importantă ca sursă de glicoalcaloizi, aclimatizată condiţiilor ţării la Institutul agronomic din Cluj, şi *Cyphomandra betacea*, existentă în sera Grădinii botanice din Cluj. Fructele lor sînt utilizate în America Centrală în loc de tomate. Ne-am ocupat atît de separarea şi identificarea carotinoidelor principale şi secundare cît şi de dinamica acestora în timpul coacerii fructelor.

MATERIAL ŞI METODE

Separarea şi identificarea pigmenţilor carotinoidici. Pentru a putea cerceta atît carotinoidele principale cît şi cele secundare, s-au extras pigmenţii din cantităţi relativ mari de fructe (100–400g). Fructele proaspete, tăiate în bucăţi, s-au mojarat cu nisip, iar terciul obţinut s-a

anhidrificat cu Na_2SO_4 sicc. şi acetonă, iar apoi s-a extras pînă la epuizare cu amestec de acetonă şi eter de petrol. Extractele reunite s-au spălat cu apă, s-au concentrat şi s-au saponificat în modul obişnuit cu KOH alcoolic 5%, 3h, la 40°C. După răcire şi adăugare de apă, pigmenţii rămaşi în hipofază au fost extraşi cu eter etilic, iar după concentrarea soluţiei la volum mic s-au adăugat la epifază.

Înainte de saponificare, pigmenţii din extract s-au comportat net epifazic, iar după saponificare s-a produs o schimbare a repartiţiei în parţial hipofazică, ceea ce denotă că xantofilele se găsesc în fructele cercetate sub formă de esteri.

Soluţia intens portocalie a pigmenţilor saponificaţi s-a spălat de repetate ori cu apă, pentru îndepărtarea metanolului, iar apoi, după uscare cu Na_2SO_4 sicc., s-a cromatografiat peste amestec de MgO + nisip (1 :2). Developarea s-a făcut cu eter de petrol conţinînd 1% acetonă.

Cromatograma extractelor saponificate din 186 g fructe semicoapte şi coapte de *Solanum lancifolium*, pe o coloană 2×30 cm, se prezintă, de sus în jos, precum urmează:

Zona nr.	*Culoarea*	*Pigmentul*	λ *max. nm*
1	galben	violaxantină	442
2	portocaliu	zeaxantină	451
3	galben	luteină	446
4	interzonă		
5	portocaliu	criptoxantină	451
6	interzonă		
7	portocaliu	β-carotină	451

Cromatograma extractelor saponificate din 390 g fructe semicoapte şi coapte de *Cyphomandra betacea*, pe o coloană 5×35 cm, se prezintă, în felul următor, de sus în jos:

Zona nr.	*Culoarea*	*Pigmentul*	λ *max. nm*
1	ocru	neidentificat	—
2	galben	violaxantină	442
3	portocaliu	zeaxantină	451
4	galben	luteină	446
5	interzonă		
6	portocaliu	criptoxantină	451
7	interzonă		
8	galben	mutatocrom	428
9	portocaliu	β-carotină	451

Fiecare zonă în parte a fost eluată şi recromatografiată pe coloană de MgO + nisip şi developată cu amestec de eter de petrol şi adaos de acetonă, în cantităţi corespunzătoare adsorbabilităţii pigmentului, în scopul de a-l purifica şi de a observa dacă nu se separă alte carotinoide secundare.

Identificarea carotinoidelor s-a făcut pe baza poziţiei în coloana cromatografică, a maximelor de absorbţie, a coeficienţilor de repartiţie, iar în cazul epoxizilor şi prin reacţia de culoare cu HCl.

Dozarea carotinoidelor. Pentru dozarea carotinoidelor s-au executat extracţii cantitative pe probe medii, de 20—100 g, din fructe verzi, semicoapte şi coapte. Prelucrarea extractelor s-a făcut ca mai sus. Diferiţii pigmenţi au fost eluaţi cantitativ, aduşi la balon cotat şi colorimetraţi faţă de azobenzen [1].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În fructele coapte ale ambelor solanacee cercetate se găsesc aceiaşi pigmenţi carotinoidici, şi anume carotinoidele comune : β-carotina, criptoxantina şi zeaxantina, însoţite de epoxizi. În fructele verzi se găsesc carotinoidele caracteristice ţesutului verde, şi anume β-carotina şi luteina. Rezultatele obţinute la dozarea pigmenţilor din fructele verzi, semicoapte sînt cuprinse în tabela 1.

Tabela 1

Conţinutul în carotinoide al fructelor de *Solanum lancifolium* şi *Cyphomandra betacea* în mg % material proaspăt

Carotinoida identificată	Fructe de *Solanum lancifolium*			Fructe de *Cyphomandra betacea*		
	verzi	semicoapte	coapte	verzi	semicoapte	coapte
β-carotină	0,75	0,20	0,09	0,07	0,14	0,24
mutatocrom	—	—	—	urme	0,07	0,03
criptoxantină	urme	0,82	1,42	0,02	0,51	0,62
luteină	0,61	0,18	0,09	0,04	0,01	urme
zeaxantină	urme	3,65	5,04	urme	0,08	0,21
violaxantină	urme	1,01	1,40	urme	0,05	0,10

Urmărind dinamica pigmenţilor în timpul coacerii fructelor, se observă, la ambele specii, o creştere pronunţată a conţinutului în criptoxantină şi zeaxantină, care se găsesc de fapt sub formă de esteri, şi o creştere moderată a conţinutului în violaxantină. În ce priveşte conţinutul în β-carotină, acesta are o creştere accentuată în decursul coacerii fructelor de *Cyphomandra betacea*, şi o scădere în cazul celor de *Solanum lancifolium*. Luteina, xantofilă caracteristică din fructele verzi, se găseşte în fructele coapte în cantităţi foarte mici.

Din datele tabelei 1 se mai observă că deşi între carotinoidele celor două solanacee cercetate este o mare asemănare în ceea ce priveşte felul pigmenţilor, există mari diferenţe cantitative, atît în ce priveşte raportul dintre β-carotină, criptoxantină şi zeaxantină, care este de 1 :15 :50, respectiv 1 :2,5 :1, cît şi în ceea ce priveşte conţinutul total în pigmenţi, care la fructele de *Solanum lancifolium* se ridică la 8 mg, iar la cele de *Cyphomandra betacea* numai la 1,2 mg la 100 g material proaspăt.

Admiţînd că biogeneza xantofilelor are loc printr-un proces de oxidare a carotinoidelor hidrocarburice, înseamnă că între cele două specii cercetate există mari deosebiri ale capacităţii de oxidare a β-carotinei în criptoxantină şi zeaxantină.

Întrucît rezultatele obţinute se referă la un material biologic dezvoltat în condiţii diferite de cele normale, valabilitatea lor este limitată, mai ales în cazul fructelor de *Cyphomandra betacea* dezvoltate în condiţii de seră. Totuşi, se poate afirma că în aceste solanacee are loc o carotenogeneză bogată de carotinoide de tip β. Deoarece la ambele specii conţinutul în luteină scade mult în timpul coacerii fructelor, este de aşteptat ca şi în condiţii normale de climă carotenogeneza carotinoidelor de tip α să fie scăzută.

Prezentat la redacţie la 17 iulie 1967

Catedra de biochimie
Institutul Agronomic „Dr. P. Groza"
Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. C. Bodea, E. Nicoară, C. Bilaus, T. Salontai, *Asupra caracterelor biochimice ale fructelor unor hibrizi vegetativi de tomate*, St. cerc. biochim., **4**, 205 (1961).
2. T. E. Kargl, F. W. Quackenbush, M. L. Tomes., *The carotene polyene system in a strain of tomatoes high in δ-carotene and its comparison with eight other tomato strains*, Proc. Amer. Soc. Horticult. Sci., **75**, 574 (1960).
3. C. Bodea, E. Nicoară, *Die Konstitution des Physoxanthins*, Liebigs Ann. Chem., **609**, 181 (1957).
4. C. Bodea, E. Nicoară, *Zur Isolierung von α-Carotin, Physoxanthin und Lutein aus Physalis alkekengi*, Liebigs Ann. Chem., **622**, 188 (1959).
5. L. Cholnoky, J. Szabolcs, E. Naghy, *Untersuchungen über die Carotinoidfarbstoffe IV, α-Kriptoxanthin*, Liebigs Ann. Chem., **616**, 207 (1958).

LES CAROTINOÏDES DES FRUITS DE *SOLANUM LANCIFOLIUM* ET DE *CYPHOMANDRA BETACEA*

RÉSUMÉ

Les fruits mûrs, de couleur orange, des deux solanacées étudiées, *Solanum lancifolium* et *Cyphomandra betacea*, contiennent les principaux pigments β-carotine, cryptoxantine et zéaxantine en quantités et proportions différentes. Parmi les carotinoïdes à structure α on a identifié seulement la lutéine, qui diminue au fur et à mesure que les fruits murissent, tandis que le contenu total des carotinoïdes s'accroît.

ST. CERC. BIOCHIM., **11**, *1*, 61–67 (1968)

DINAMICA ADN ŞI ARN ÎN DIFERITE FAZE DE VEGETAŢIE LA PORUMBUL HIBRID

D. OŞIANU, C. BILAUS, S. CERNEA şi C. BODEA

Rezumat. — S-a urmărit dinamica acizilor nucleici în diferite organe ale unor linii şi hibrizi de porumb, în fazele de vegetaţie mai importante. S-a constatat în general că organele tinere au un conţinut mai mare în acizi nucleici, care scade pe măsura maturizării lor.

Cantitatea de ARN depăşeşte pe cea de ADN. ADN a fost găsit în cantităţi dozabile numai în organele generative.

Nu se observă diferenţe principiale în dinamica acizilor nucleici la hibrizii dubli, în comparaţie cu hibrizii simpli şi cu liniile lor parentale.

În cercetările noastre din ultimii ani asupra substratului biochimic al fenomenului de heterozis la porumb, am constatat existenţa unor corelaţii între conţinutul în ADN şi ARN al seminţelor de porumb şi fenomenul de heterozis [1], [2]. Paralel cu aceste cercetări, am început un studiu asupra dinamicii ADN şi ARN în diferite faze de vegetaţie a porumbului hibrid. Ni s-a părut interesant acest studiu, ţinînd seama de legătura funcţională care există între biosinteza acizilor nucleici şi unele procese metabolice fundamentale, cum sînt fotosinteza, biosinteza proteinelor şi altele.

Din datele găsite în literatură reiese că în general acumularea acizilor nucleici în plante precede acumularea substanţei uscate şi a compuşilor cu fosfor. La porumb acumularea este mai intensă în fazele timpurii ale creşterii organelor vegetative şi în perioada formării şi creşterii ştiuletelui [3].

În cercetările noastre am urmărit acumularea acizilor nucleici în diferite organe ale porumbului, în momentul apariţiei acestora, precum şi modificările survenite la apariţia unui alt organ. Astfel am determinat acizii nucleici în conul de creştere la apariţia frunzei a treia, a cincea şi a şaptea, la apariţia paniculului, a ştiuletelui şi în diferite faze de maturizare a acestuia. În ultimul an (1966) am urmărit dinamica acizilor nucleici şi în plantele tinere, cu 1, 2 şi 3 frunze.

MATERIAL ŞI METODE

A fost cercetată dinamica acizilor nucleici timp de 3 ani consecutiv. În primul an (1964) s-a cercetat hibridul 101, rezultatele obţinute avînd un caracter orientativ. În al doilea an (1965) s-au analizat hibrizii dubli de porumb 100 şi 103, ambii timpurii. În anul 1966 s-a ales hibridul

dublu semitimpuriu 208, ca și hibrizii simpli din care au provenit și liniile parentale ale acestora. S-a urmărit de asemenea existența vreunei diferențe în dinamica acizilor nucleici la hibridul dublu, în comparație cu hibrizii simpli și liniile lor parentale.

Acizii nucleici au fost determinați în primii 2 ani în următoarele organe : conul de creștere, noduri, panicul și știulete, iar în 1966 și în plantele tinere cu 1, 2 și 3 frunze.

Dozarea ARN și ADN s-a făcut după metoda Schmidt și Thanhauser [4], bazată pe determinarea acidului fosforic din acizii nucleici, după îndepărtarea celorlalți compuși cu fosfor. Metoda a fost adaptată materialului studiat, lucrîndu-se cum urmează :

1—2 g material proaspăt s-a introdus în alcool fierbinte, unde s-a ținut timp de 3 minute, pentru a provoca încetarea activității enzimatice. S-a mojarat materialul cu 10—20 ml acid tricloracetic 7%, răcit în prealabil la 0°C, și s-a păstrat la această temperatură timp de 20 min, după care s-a filtrat sub presiune scăzută, s-a spălat cu apă cu gheață, pentru îndepărtarea acidului tricloracetic, apoi cu etanol și eter etilic. Reziduul uscat s-a refluxat de 3 ori cîte 3 minute, cu 10—20 ml amestec etanol-eter etilic (3 :1), pentru îndepărtarea fosforului lipidic și a pigmenților. După filtrare și uscare, materialul s-a tratat cu KOH N (în proporție de 10 ml la 1 g material proaspăt) și s-a păstrat 20 de ore la temperatura camerei, timp în care a avut loc hidroliza ARN în mononucleotide.

Pentru separarea ADN rămas nehidrolizat, s-a adăugat un amestec de 10 ml acid tricloracetic 7% și 2,5 ml HCl 6 N și s-a filtrat. Filtratul care conținea produsele de hidroliză ale ARN s-a adus la un volum de 50 ml. Din precipitat, ADN a fost extras prin încălzire timp de 15 minute, la 90°C, cu 15 ml TCA 5%. Proteinele precipitate s-au separat prin filtrare, iar filtratul s-a adus la un volum de 25 ml.

Pentru transformarea fosforului organic în ortofosfat anorganic, cîte 20, respectiv 10 ml din soluțiile ce conțineau produșii de hidroliză ai ARN, respectiv ADN nehidrolizat, s-au mineralizat cu amestec sulfonitric. La fel s-a procedat cu o probă standard (avînd o concentrație de 10 mg P%). Determinarea acidului fosforic s-a făcut colorimetric, după transformarea prealabilă a acestuia în complex fosfomolibdenic.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele preliminare obținute în anul 1964 fiind în concordanță cu cele ale anilor următori, prezentăm în tabelele 1 și 2 rezultatele obținute în anul 1965, iar în tabelele 3, 4, 5, 6 și 7 cele obținute în anul 1966.

În plantele tinere, cu 1,2 și 3 frunze (tabela 3), se observă la început (apariția primei frunze) un conținut mare în ARN, care apoi scade treptat, ceea ce arată că începutul dezvoltării plantei este legat de o biosinteză intensă a acizilor nucleici. ADN nu apare în cantități dozabile.

Un conținut mare de acizi nucleici în fazele inițiale de creștere a fost observat și la grîu, de către V. N. Stoletov și colaboratorii [5].

Făcînd o comparație între hibrizii simpli și liniile lor parentale, se observă la început un conținut mai ridicat în ARN la hibrizi, ceea ce nu se mai poate sesiza în fazele următoare de creștere. Hibridul dublu prezintă valori intermediare față de hibrizii simpli parentali.

În conul de creștere (tabelele 1 și 4) se observă o scădere treptată a conținutului în ARN pe măsura diferențierii celorlalte organe. Cantitatea de ADN în conul de creștere este nedozabilă. Nu se constată nici o diferență între hibrizi și liniile lor parentale.

În noduri, cantitatea de ARN scade (tabelele 1 și 7) pe măsura dezvoltării plantei. Nodurile superioare au un conținut mai bogat

Tabela 1

Conținutul în ARN al organelor vegetative la hibrizii dubli 100 și 103 (g/100 g material uscat)

Organul / Data	Conul de creștere		Nodul 1		Nodurile superioare	
	HD 100	HD 103	HD 100	HD 103	HD 100	HD 103
14.VI.1965	0,879	1,04				
28.VI.1965	0,833	0,914				
5.VII.1965	0,861	0,789				
15.VII.1965	0,580	0,490	0,115	0,072	0,238	0,145
28.VII.1965			—	—	0,114	0,014
3—6.VIII. 1965			—	—	0,021	—

Tabela 2

Conținutul în acizi nucleici al organelor generative la hibrizii dubli 100 și 103 (g/100 g material uscat)

Organul / Data	Panicul				Știulete			
	HD 100		HD 103		HD 100		HD 103	
	ARN	ADN	ARN	ADN	ARN	ADN	ARN	ADN
15.VII.1965	1,113	0,303	0,787	0,444				
28.VII.1965	0,193	0,136	0,241	0,097	0,721	0,381	0,904	0,555
3—6.VIII.1965	0,223	0,072	0,204	0,104	1,055	0,395	0,602	0,318
2.IX.1965					0,443	0,173	0,431	0,096
27.IX.1965					0,385	0,181	0,400	0,180

Tabela 3

Conținutul în ARN al plantelor tinere cu 1,2 și 3 frunze (g/100 g material uscat)

Data / Planta	22.IV.1966	27.IV.1966	3.V.1966
Linia A	0,613	0,661	0,394
Linia B	0,545	0,578	0,334
Hibrid simplu A× B	0,650	0,519	0,291
Linia C	0,833	0,567	0,324
Linia D	0,822	0,505	0,454
Hibrid simplu C× D	0,921	0,437	0,278
Hibrid dublu 208	0,849	0,526	0,327

Tabela 4

Conținutul în ARN al conului de creștere (g/100 g material uscat)

Planta \ Data	19.V.1966	12.VI.1966	17.VI.1966
Linia A	0,647	0,598	0,593
Linia B	0,668	0,635	0,467
Hibrid simplu A × B	0,684	0,531	0,481
Linia C	0,778	0,619	0,457
Linia D	0,435	0,361	0,386
Hibrid simplu C × D	0,514	0,421	0,380
Hibrid dublu 208	0,623	0,556	0,421

Tabela 5

Conținutul în ARN al paniculului (g/100 g material uscat)

Planta \ Data	28.VI.1966	8.VII.1966	15—18.VII. 1966	25—29.VII. 1966	15.VIII.1966
Linia A	1,24	0,632	0,318	0,237	0,182
Linia B	1,42	0,708	0,257	0,290	0,193
Hibrid simplu A × B	1,09	0,756	0,285	0,257	0,228
Linia C	1,78	0,722	0,261	0,357	0,156
Linia D	1,79	0,676	0,327	0,249	0,197
Hibrid simplu C × D	1,11	0,972	0,421	0,322	0,190
Hibrid dublu 208	1,39	0,690	0,268	0,308	0,200

Conținutul în ADN al paniculului (g/100 g material uscat)

Planta \ Data	28.VI.1966	8.VII.1966	15—18.VII. 1966	25—29.VII. 1966	4—15.VIII. 1966
Linia A	0,856	0,468	0,209	0,090	0,100
Linia B	0,820	0,505	0,172	0,073	0,096
Hibrid simplu A × B	0,548	0,284	0,198	0,093	0,108
Linia C	0,545	0,538	0,176	0,070	0,129
Linia D	0,788	0,670	0,194	0,091	0,114
Hibrid simplu C × D	0,429	0,309	0,234	0,103	0,116
Hibrid dublu 208	0,632	0,185	0,226	0,083	0,103

Tabela 6

Conţinutul în ARN al ştiuletelui (g/100 g material uscat)

Planta \ Data	15—18.VII. 1966	25—29. VII.1966	4—15.VIII 1966	10.IX.1966	1.XI.1966
Linia A	0,405	1,34	0,467	0,425	0,387
Linia B	0,418	1,35	0,516	0,468	0,379
Hibrid simplu A×B	0,420	1,39	0,581	0,453	0,385
Linia C	0,479	1,07	0,496	0,385	0,203
Linia D	0,413	1,08	0,453	0,376	0,299
Hibrid simplu C×D	0,507	1,19	0,580	0,503	0,369
Hibrid dublu 208	0,392	1,34	0,472	0,358	0,271

Conţinutul în ADN al ştiuletelui (g/100 g material uscat)

Planta \ Data	15—18.VII. 1966	25—29.VII. 1966	4—15.VII. 1966	10.IX.1966	1.XI.1966
Linia A	0,459	0,278	0,190	0,187	0,191
Linia B	0,339	0,279	0,177	0,173	0,165
Hibrid simplu A×B	0,468	0,336	0,237	0,208	0,186
Linia C	0,472	0,271	0,204	0,199	0,186
Linia D	0,428	0,293	0,203	0,154	0,090
Hibrid simplu C×D	0,434	0,374	0,243	0,220	0,200
Hibrid dublu 208	0,442	0,376	0,159	0,144	0,146

decît cele inferioare. În momentul apariţiei ştiuletelui cantitatea de ARN conţinută în nodurile inferioare devine nedozabilă.

ADN nu a putut fi identificat în noduri.

În panicul apar, în cantităţi dozabile, atît ARN cît şi ADN, conţinutul în ARN fiind mai mare decît cel în ADN. În primele faze de formare, paniculul are un conţinut mai ridicat în ARN decît celelalte organe; în timpul creşterii lui acest conţinut scade, la început brusc, apoi foarte lent (tabelele 2 şi 5). Cantitatea de ADN, destul de mare la început, scade şi ea, pentru ca la sfîrşit să arate o uşoară creştere (tabelele 1 şi 4).

La hibrizi, conţinutul în acizi nucleici al paniculului este la început mai scăzut decît la liniile parentale, devenind pe parcurs egal, iar în unele cazuri chiar mai mare.

În ştiulete apar atît ARN cît şi ADN, la început în cantităţi aproape egale, apoi conţinutul în ARN creşte considerabil (tabelele 2 şi 6), pentru ca în decursul formării şi umplerii boabelor să scadă din nou, iar la maturitate să rămînă practic constant. Acest lucru a fost observat şi la alte plante. Astfel, Kulka [6], [7] găseşte la secară o cantitate de acizi nu-

Tabela 7

Conţinutul în ARN al nodului 1 (g/100 g material uscat)

Planta \ Data	28.VI.1966	8.VII.1966	15—18. VII.1966
Linia A	0,077	0,011	—
Linia B	0,108	0,026	—
Hibrid simplu A×B	0,108	0,038	—
Linia C	0,102	0,030	—
Linia D	0,124	0,028	—
Hibrid simplu C×D	0,080	0,036	—
Hibrid dublu 208	0,079	0,024	—

Conţinutul în ARN al nodurilor superioare 1 (g/100 g material uscat)

Planta \ Data	8.VII. 1966	15—18. VII. 1966	25—29. VII.1966	4—15. VIII.1966
Linia A	0,083	0,057	0,026	0,013
Linia B	0,114	0,041	0,020	0,018
Hibrid simplu A×B	0,093	0,043	0,024	0,016
Linia C	0,112	0,037	0,033	0,016
Linia D	0,094	0,033	0,028	0,020
Hibrid simplu C×D	0,095	0,047	0,030	0,022
Hibrid dublu 208	0,092	0,051	0,025	0,004

cleici mai mare în primele faze ale dezvoltării bobului, care apoi scade spre maturizarea acestuia, iar Galitz şi Howel [8], studiind cantitatea de ARN în seminţele de soia în curs de formare, constată căconţinutul total în ARN creşte cu puţin în timpul primei perioade de dezvoltare şi scade în cursul maturizării seminţelor.

Spre deosebire de ARN, cantitatea de ADN conţinută în ştiulete scade treptat (tabelele 2 şi 6).

În ştiuletele hibrizilor se observă în general un conţinut în acizi nucleici mai ridicat decît la liniile parentale; hibridul dublu prezintă valori asemănătoare cu ale liniilor parentale.

CONCLUZII

Urmărind variaţia conţinutului în acizi nucleici în diferitele organe vegetative şi reproductive la plantele de porumb, se constată că în general organele tinere sînt mai bogate în acizi nucleici, conţinutul acestora scă-

zînd pe măsura maturizării lor. Excepţie face ştiuletele, în cazul căruia la început are loc o creştere puternică de ARN, urmată de o scădere bruscă.

Este interesant de remarcat că, în general, la apariţia unui nou organ, cantitatea de acizi nucleici din celelalte organe scade.

ADN nu apare în cantităţi dozabile decît în panicul şi ştiulete. În aceste organe, cantitatea de ARN întrece considerabil cantitatea de ADN.

Nu se observă nici o diferenţă principială în dinamica acizilor nucleici, în timpul dezvoltării plantei, între hibrizii dubli, hibrizii simpli şi liniile lor parentale.

Prezentată la redacţie la 23 iunie 1967

Catedra de chimie şi biochimie,
Institutul Agronomic „Dr. P. Groza"
Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. C. Bodea, D. Oşianu, I. Căbulea, *Cercetări asupra unor caractere biochimice speciale ale porumbului. III. Manifestarea heterozisului acizilor nucleici la hibrizii simpli între liniile consangvinizate de porumb*, St. cerc. biochim., **6**, 491 (1963).
2. D. Oşianu, C. Bodea, *Untersuchungen über spezielle biochemische Eigenschaften des Maises. IV. Beeinflussung des RNS und DNS-Gehaltes der Samen durch Hybridierung*, Rev. Roum. Biochim., **4**, 133 (1967).
3. G. S. Kuramsin, *Nakoplenie nucleinovîh kislot i suhovo vescestva rasteniami kukuruzi v protese formirovania urojaia*, Tr. Baskirsk. s.h. in-ta., **10**, 59 (1961).
4. G. Schmidt, S. I. Thanhauser, *A method for the determination of the deoxiribonucleic, ribonucleic acids and of the phosphoprotein in animal tissues*, J. biol. Chem., **161**, 83 (1945).
5. V. N. Stoletov, E. V. Budnitkaia, S. R. Agmalova, *Osobennosti izmeneniia obmena nukleinovîh kislot v ontogheneze raznîh form pşenifi*, Izv. Akad. Nauk SSSR, ser. Biol., **6**, 836 (1965).
6. K. Kulka, *Acizii nucleici în dezvoltarea bobului de secară. I. Conţinutul total de acizi nucleici în bobul în curs de formare*, Rev. ref. Cult. pl. de cîmp, **II**, *4*, 52 (1966).
7. K. Kulka, *Acizii nucleici în dezvoltarea bobului de secară. II. Dinamica ADN şi ARN şi a unor fracţii ale compuşilor fosforici în bobul în curs de formare*, Rev. ref. Cult. pl. de cîmp, **II**, *4*, 53 (1966).
8. D. S. Galitz, R. W. Howel, *Conţinutul în acizi ribonucleici şi a nucleotidelor libere din seminţele de soia în curs de formare*, Rev. ref. Cult. pl. de cîmp, **II**, *3*, 1072 (1966).

DIE DYNAMIK VON DNS UND RNS IN VERSCHIEDENEN PFLANZENWUCHSSTADIEN BEIM HYBRIDMAIS

ZUSAMMENFASSUNG

Man hat die Dynamik der Nucleinsäuren in verschiedenen Organen der Linien und Hybride des Maises in seinen wichtigeren Pflanzenwuchsstadien verfolgt. Die jungen Organe haben einen grösseren Nucleinsäuregehalt, der aber mit zunehmender Reife abfällt. Der RNS-Gehalt ist grösser als der DNS-Gehalt. Man findet DNS in dosierbaren Mengen nur in den Wuchsorganen.

Die Dynamik der Nucleinsäuren zeigt keine bedeutende Unterschiede weder bei den doppelten und einfachen Hybriden noch bei ihren elterlichen Linien.

ST. CERC. BIOCHIM., **11**, *1*, 69–74 (1968)

UTILIZAREA AGAROZEI LEGATE ÎNCRUCIȘAT ÎN CROMATOGRAFIA DE EXCLUDERE MOLECULARĂ

HORST D. SCHELL și VICTOR GHEȚIE

Rezumat. — Prin legarea încrucișată a agarozei cu epiclorhidrină s-au obținut preparate capabile să facă cernere moleculară. Agarozele legate încrucișat se îmbibă în soluții apoase, la temperatura camerei, formînd geluri cu transparență și proprietăți mecanice analoge acelora ale gelurilor de Sephadex.
Cromatografia de excludere moleculară cu geluri de agaroză legate încrucișat a fost întrebuințată la desalifiere (îndepărtarea sulfatului de amoniu din soluții proteice) și la purificarea proteinelor și anticorpilor fluorescenți (îndepărtarea izotiocianatului de fluoresceină). Agaroza X-2 a fost folosită la separarea lizozimului de albumină și poate servi ca mediu pentru fracționarea proteinelor cu greutatea moleculară cuprinsă între 3 000 și 70 000.

Cromatografia de excludere moleculară (sau gel-filtrarea) utilizează mai ales trei tipuri de medii pentru cernerea moleculară, și anume : geluri de dextran legat încrucișat (Sephadex), geluri de poliacrilamidă legată încrucișat (Bio-Gel) și geluri de agaroză (Sagarose, Sepharose).

Gelurile de agaroză, spre deosebire de celelalte două medii, nu sînt obținute prin reacții chimice de legare încrucișată, ci rezultă prin răcirea soluțiilor de agaroză, încălzite în prealabil, în prezența unor detergenți și sub o agitare mecanică riguros controlată [1]. Se formează granule sferice de agaroză, alcătuite dintr-o rețea de lanțuri polizaharidice unite prin legături de hidrogen. Gelurile au o rețea cu atît mai laxă cu cît concentrația inițială de agaroză este mai mică. Dimensiunile ochiurilor rețelei determină mărimea moleculelor care pot fi reținute sau excluse de către granulele de agaroză. Utilizînd granule sferice de agaroză [1],[2] preparate pornind de la concentrații mici de agaroză ($\sim 2\%$), s-a realizat separarea unor molecule foarte mari [3], a virusurilor [4] și chiar a particulelor subcelulare [5].

Dacă granulele de agaroză se deshidratează, structura lor se destramă și nu se mai poate reface prin îmbibarea materialului uscat, spre deosebire de ceea ce se petrece cu gelurile de dextran sau cu cele de poliacrilamidă. Din această cauză, gelurile de agaroză utilizate în cromatografia de excludere moleculară se livrează numai în suspensie și se păstrează în această formă.

Pentru a obține un gel de agaroză care să se poată hidrata și manipula ca și gelurile pe bază de dextran și poliacrilamidă, am procedat la legarea încrucișată a lanțurilor polizaharidice cu ajutorul epiclorhidrinei, utilizînd o cale folosită la prepararea Sephadexilor [6], [7]. Această legare este

posibilă datorită faptului că agaroza posedă 4 grupări hidroxil libere pentru fiecare unitate structurală alcătuită din resturi alternative de D-galactoză şi 3,6-anhidro-L-galactoză. Legarea lor încrucişată duce la formarea unei reţele cu atît mai laxe cu cît cantitatea de epiclorhidrină folosită este mai mică (fig. 1).

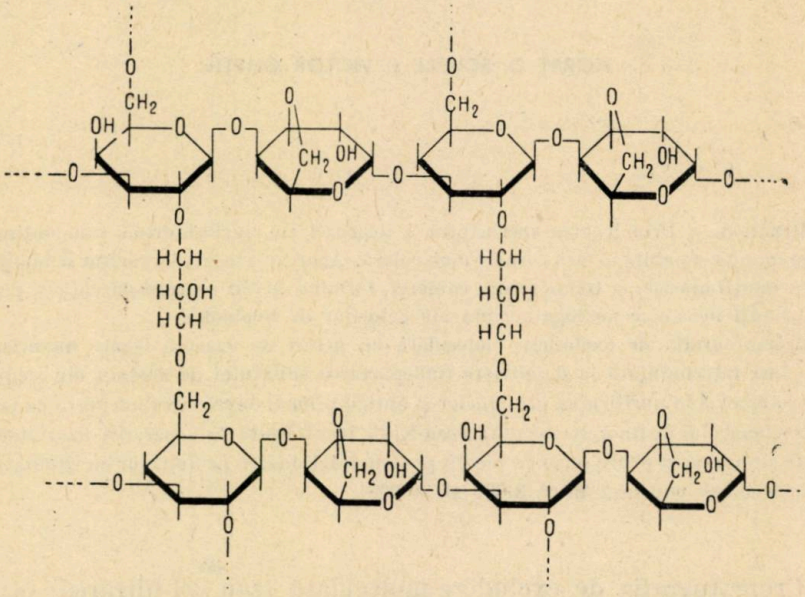


Fig.1. — Detaliu din structura gelului de agaroză legată încrucişat (Structura agarozei, după Araki [1956]).

Prin acţiunea unor cantităţi variabile de epiclorhidrină asupra agarozei s-au preparat 4 tipuri de agaroză legată încrucişat, notate cu X30, X15, X7,5 şi X2[1] (semnul X arată că agaroza este legată încrucişat, iar cifra indică cantitatea de epiclorhidrină, în grame, folosită pentru legarea încrucişată a 100 g agaroză). S-a cercetat apoi capacitatea acestor preparate de a face cernere moleculară, utilizînd substanţe micromoleculare (sulfat de amoniu şi izotiocianat de fluoresceină) şi macromoleculare (lizozim, albumină, γ G-globulină şi blue-dextran).

MATERIAL ŞI METODE

Prepararea agarozei legate încrucişat (agaroza X). 10 g agaroză se introduc treptat în 30 ml soluţie de hidroxid de sodiu 5 N, răcită în jur de 0°C. După o omogenizare de aproximativ 30 min, se adaugă în 3—4 porţiuni, tot la rece, o cantitate variabilă de epiclorhidrină (între 0,2 g pentru X-2 şi 3 g pentru X-30). Se amestecă bine conţinutul vasului de reacţie, timp de 20—30 min. Se încălzeşte apoi amestecul de reacţie pe baia de apă timp de 1 oră la 40—45°C şi se amestecă pînă cînd se formează un gel fragil care se fărîmiţează în particule mici. Pentru

[1] Produşii au fost înregistraţi la Oficiul de Stat pentru Invenţii cu nr. 51 181 din 4 martie 1966.

terminarea reacției, încălzirea este continuată încă 2—3 ore la temperatura de 70—75°C. Produsul de reacție este apoi răcit, spălat prin decantare de repetate ori cu apă distilată, fărîmițat în particule mici cu ajutorul unui omogenizator cu cuțite și lăsat peste noapte în 800—1000 ml apă distilată. A doua zi se decantează supernatantul, se spală particulele de gel de cîteva ori cu apă distilată (pînă la reacție neutră), se filtrează pe o pîlnie de sticlă G 1, se deshidratează cu etanol sau acetonă și se usucă. Se obțin 10,5 g agaroză X-30. Materialul uscat se cerne printr-un sistem de site care permite obținerea fiecărui tip de agaroză X în două sortimente, unul de 50—100 mesh și celălalt de 100—200 mesh.

Determinarea apei reținute (water regain). S-a folosit o instalație și un procedeu asemănător celui recomandat de P. Flodin [6].

Cromatografia de excludere moleculară. S-au utilizat coloane de 20—23/1 cm. Încărcarea lor s-a făcut cu o suspensie de agaroză X îmbibată 24 de ore. Eluția s-a făcut cu o soluție de NaCl 0,145 M, viteza de curgere fiind 20—30 ml/oră. S-au folosit ca substanțe test : sulfat de amoniu (Reactivul), izotiocianat de fluoresceină (Fluka), lizozim (NBCo), albumină serică umană (Behringwerke AG), γG-globulină (preparată din ser de iepure prin precipitare cu sulfat de amoniu și cromatografie pe DEAE-celuloză) și blue-dextran 2000 (Pharmacia).

Ca mediu de referință s-a folosit agaroza (Industrie biologique française), însă nu sub formă de gel, ci ca suspensie preparată ca și agarozele X și apoi încărcată în coloană.

Eluatele, colectate în fracțiuni de cîte 2 ml, s-au analizat prin spectrofotometrie la 208 mμ (pentru proteine), prin fotometrie la 470 mμ (pentru izotiocianatul de fluoresceină), la 660 mμ (pentru blue-dextran) și la 660 mμ după adăugare de $BaCl_2$ (pentru sulfatul de amoniu).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În urma legării încrucișate a agarozei cu cantități variabile de epiclorhidrină, toți cei 4 produși obținuți (X30, X15, X7,5 și X2)sînt insolubili în soluții apoase la cald și rețin o cantitate de apă cu atît mai mică cu cît conțin un număr mai mare de legături încrucișate (tabela 1).

Tabela 1

Apa reținută de diferite tipuri de agaroză X și agaroză, în comparație cu unele tipuri de Sephadex

Denumirea tipului de agaroză	Apa reținută (g apă/gel uscat)	Tipul de Sephadex care reține o cantitate similară de apă*
Agaroză	10,0	—
X—2	9,1	G—100
X—7,5	6,8	G—75
X—15	4,7	G—50
X—30	2,6**	G—25

* Va'ori date de producător (Pharmacia).

** Valoare calculată.

Introduse în soluții apoase, preparatele de agaroză X se îmbibă și formează granule geliforme, a căror transparență și stabilitate mecanică sînt asemănătoare cu cele ale gelului de Sephadex. De aceea, pentru prelucrarea gelurilor de agaroză X și utilizarea lor în gel-filtrare se recurge la procedeele aplicate în cazul gelurilor de Sephadex.

Capacitatea de cernere a gelurilor de agaroză X s-a testat separîndu-se de proteine sulfatul de amoniu (fig. 2) şi izotiocianatul de fluoresceină (fig. 3).

Rezultatele obţinute dovedesc că aragoza X poate fi întrebuinţată cu succes, ca şi Sephadex-ul G-25 şi G-50, la desalifierea soluţiilor proteice şi la purificarea preparatelor de anticorpi[2] şi de proteine fluoro-

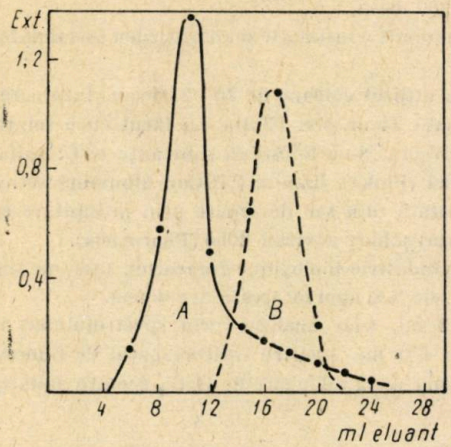


Fig. 2. — Separarea unui amestec de ser de iepure şi sulfat de amoniu pe gel de agaroză X-7,5.

Linia continuă = extincţia la 280 mμ; linia întreruptă = extincţia la 660 mμ. Peste 1 ml de ser de iepure s-au adăugat circa 0,2 ml sulfat de amoniu saturat. S-au introdus în coloană 0,4 ml din acest amestec. *A* = proteină; *B* = sulfat de amoniu.

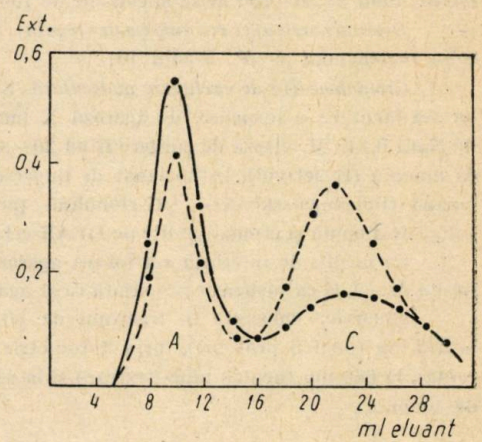


Fig. 3. — Separarea izotiocianatului nereacţionat de albumina serică umană fluorocromată pe gel de agaroză X-15.

Linia continuă = extincţia la 280 mμ; linia întreruptă = extincţia la 460 mμ. S-a încărcat coloana cu 0,75 ml soluţie de albumină fluorocromată (1 g%) ce conţine izotiocianat liber. *A* = albumină fluorocromată; *C* = izotiocianat de fluoresceină (prezintă o absorbţie şi la 280 mμ).

cromate. În plus, agaroza X nu adsoarbe colorantul fluorescent atît de puternic ca Sephadex-ul, şi astfel coloana poate fi mai uşor debarasată de izotiocianatul de fluoresceină.

Faptul că cernerea moleculară realizată de agarozele X-15 şi X-7,5 este rezultatul legării încrucişate se dovedeşte prin incapacitatea agarozei de a face satisfăcător separarea sus-amintită (fig. 4 *a*). Se observă, în acelaşi timp, că agaroza X-2 poate realiza separarea simultană a proteinelor de micromolecule (fig. 4 *b*).

Aceste experienţe au arătat totodată că nici una din agarozele X folosite nu este capabilă să separe proteinele serice. Sub acest aspect, aragoza X-2 este inferioară Sephadex-ului G-100; deşi au aproape aceeaşi capacitate de reţinere a apei, ultimul este capabil să separe proteinele serice în două fracţiuni [6], în timp ce agaroza X-2 nu poate separa albumina de γG-globulină.

Agaroza X-2 este capabilă să separe un amestec de albumină serică umană şi lizozim, comportare analogă gelului de Sephadex G-75 [6] (fig. 5 *a*). Rezultă că gelul cel mai poros de agaroză (X-2) este capabil să separe

[2] O separare analogă cu cea din fig. 3 s-a obţinut şi cu preparate de anticorpi fluorescenţi conţinînd fluorocrom liber, nereacţionat.

peptidele şi proteinele cu o greutate moleculară cuprinsă între 3 000 şi 70 000 [8]. Faptul că albumina serică umană (G. m. 69 000) este exclusă din gel într-un volum egal cu cel al spaţiului gol determinat cu blue dextran (fig. 5 *b*) pare să confirme că limita maximă de excludere completă, indicată pentru Sephadex G-75 (70 000), poate fi asemănătoare cu cea a agarozei X-2.

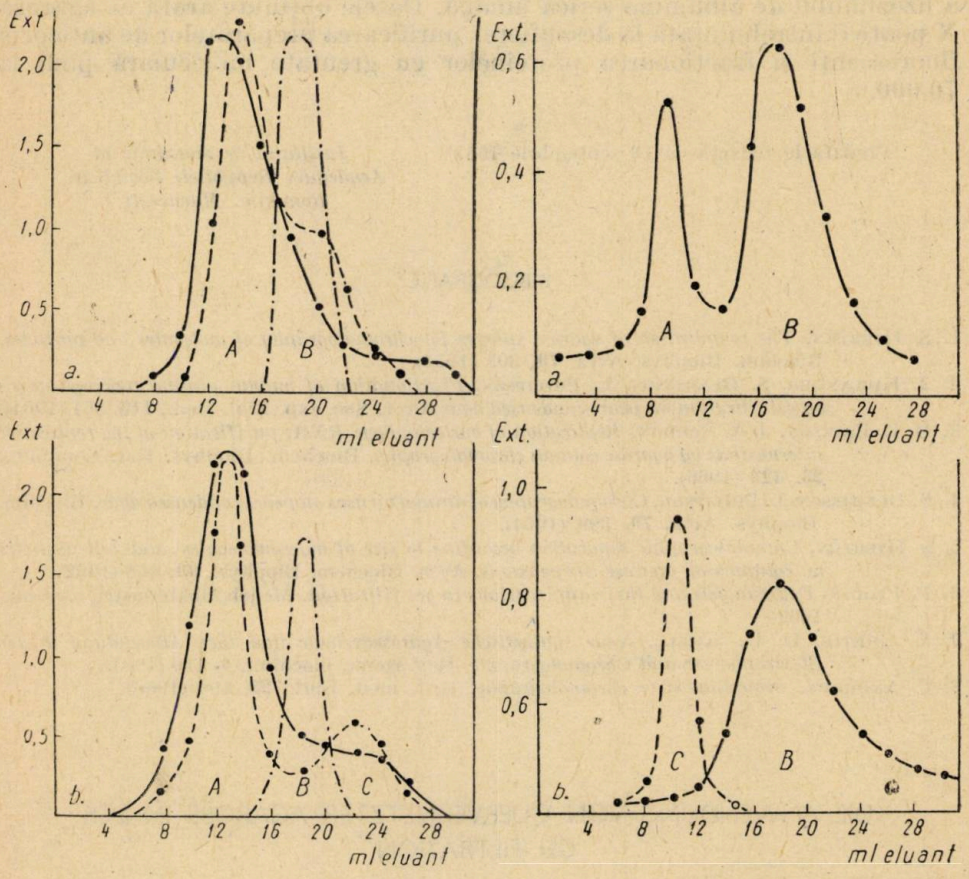


Fig. 4. — Analiza unui amestec de ser uman fluorocromat, izotiocianat de fluoresceină şi sulfat de amoniu cu agaroză (*a*) şi agaroză X-2 (*b*). Linia continuă = extincţia la 280 mμ; linia întreruptă = extincţia la 460 mμ; linia punctată = extincţia la 660 mμ. Coloana s-a încărcat cu 0,7 ml ser de om fluorocromat în exces cu izotiocianat de fluoresceină şi care conţine sulfat de amoniu. *A* = proteina fluorocromată; *B* = sulfat de amoniu; *C* = izotiocianat de fluoresceină.

Fig. 5. — Separarea lizozimului de albumina serică umană (*a*) şi de blue-dextran 2000 (*b*). Linia continuă = extincţia la 280 mμ; linia întreruptă = extincţia la 660 mμ; *A* = albumină; *B* = lizozim; *C* = blue-dextran 2000. În coloană s-a introdus 1 ml soluţie ce conţine 5 mg albumină şi 15 mg lizozim (*a*) şi 10 mg lizozim şi circa 2 mg blue-dextran (*b*).

Incapacitatea agarozei X-2 de a fracţiona proteinele cu greutate moleculară mai mare de 70 000 nu trebuie neapărat pusă pe seama porozităţii granulelor de agaroză X. Ea s-ar putea datori şi dimensiunilor coloanelor folosite de noi (20—24 cm), care sînt considerabil mai scurte decît cele utilizate pentru gelurile de Sephadex (50—100 cm).

CONCLUZII

Legarea încrucişată cu epiclorhidrină a moleculelor de agaroză duce la obţinerea unor preparate care pot face cernere moleculară. Cu ajutorul lor s-a realizat separarea prin cromatografie de excludere moleculară a sulfatului de amoniu şi a izotiocianatului de fluoresceină de proteine, ca şi a lizozimului de albumina serică umană. Datele obţinute arată că agaroza X poate fi întrebuinţată la desalifiere, purificarea preparatelor de anticorpi fluorescenţi şi fracţionarea proteinelor cu greutate moleculară pînă la 70 000.

Predată la redacţie la 18 septembrie 1967

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. S. Hjertén, *The preparation of agarose spheres for chromatography of molecules and particles*, Biochim. Biophys. Acta, **79**, 393 (1964).
2. J. Killander, S. Bengtsson, L. Philipson, *Fractionation of human plasma macroglobulins by gel filtration on pearl-condensed agar*, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **115**, 861 (1964).
3. R. L. Erikson, J. A. Gordon, *Replication of bacteriophage RNA, purification of the replicative intermediate by agarose column chromatography*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **23**, 422 (1966).
4. S. Bengtsson, L. Philipson, *Chromatography of animal viruses on pearl-condensed agar*, Biochim. Biophys. Acta, **79**, 399 (1964).
5. S. Hjertén, *Chromatographie separation according to size of macromolecules and cell particles on columns of agarose suspensions*, Arch. Biochem. Biophys., **99**, 466 (1962).
6. P. Flodin, *Dextran gels and their applications in gel filtration*, Meijels Bokindustri, Uppsala, 1962.
7. V. Gheţie, H. D. Schell, *Neue synthetische Agarosederivate und ihre Anwendung in der Elektrophorese und Chromatographie*, Rev. roum. biochim., **4**, 116 (1967).
8. P. Andrews, *Molecular-sieve chromatography*, Brit. med. Bull., **22**, 109 (1966).

DIE ANWENDUNG VON QUERVERNETZTER AGAROSE IN DER GEL-FILTRATION

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Quervernetzung der Agarose mit Epichlorhydrin wurden Präparate mit Siebeffekt erzielt. Die quervernetzten Agarosepräparate bilden in wässrigen Lösungen bei Zimmertemperatur Gelkörner, deren Transparenz und mechanische Eigenschaften denen der Sephadex-Gelkörner ähnlich sind.

Die quervernetzte Agarose wurde als Trägermedium in der Ausschlusschromatographie bei der Entsalzung kolloidaler Lösungen (Entfernung von Ammoniumsulfat aus Proteinlösungen) und bei der Reinigung fluorochromierter Eiweissstoffe und Antikörper (Entfernung von Fluoreszeinisothiocyanat) angewandt. Die quervernetzte Agarose X-2 wurde zur Trennung des Lysozyms von Albumin angewandt und kann als Trägermedium zur Fraktionierung von Eiweissstoffen mit einem Molgewicht Zwischen 3 000 und 70 000 dienen.

ST. CERC. BIOCHIM., **11**, *1*, 75–82 (1968)

FORME MULTIPLE ALE IZOTRANSAMINAZEI ASPARTICE MITOCONDRIALE DIN FICATUL DE ŞOBOLAN

CECILIA ŞELARIU

Rezumat. — S-au întrebuinţat ca izoenzime transaminazice aspartice proteinele solubile intramitocondriale extrase prin îngheţare-dezgheţare şi citoplasma de la 105 000 g. Prin electroforeza în agar a citoplasmei s-au obţinut trei fracţiuni cu activitate transaminazică. S-a arătat natura citoplasmatică a acestor trei izoenzime prin comportare la două pH-uri şi reacţie cu serurile omolog şi eterolog.
Prin electroforeza în agar a enzimei mitocondriale s-au obţinut 6 fracţiuni cu activitate transaminazică. S-a constatat, prin reacţie cu serurile omolog şi eterolog şi comportare la două pH-uri, natura mitocondrială a acestor 6 izoenzime.
Concentrarea preparatelor intracelulare, cît şi a eluantelor fracţiunilor de pe electroforegrame au dus la evidenţierea formelor multiple ale fiecărei izoenzime. Se discută posibilitatea ca aceste forme să fie doar un artefact, arătîndu-se argumentele care vin în favoarea existenţei lor reale.

În 1960, Fleischer şi colaboratorii [1] au separat din extractele apoase de diferite ţesuturi două izoenzime ale transaminazei aspartice (L-aspartat ; 2-oxoglutarat aminotransferaze EC 2. 6. 1. 1.). Ulterior s-a demonstrat că izoenzima I, care migrează spre anod, este localizată în fracţiunea celulară, citoplasmă (supernatantul de la 105 000 g), în timp ce izoenzima II, care migrează spre catod, este localizată în mitocondrii [2]. Concomitent au început să apară lucrări care au arătat eterogenitatea izoenzimei din citoplasmă. Prin cromatografiere pe DEAE-celuloză s-au evidenţiat în extractele saline de ţesut două izoenzime anodice [3], [4]. Prin electroforeză în amidon şi colorare directă s-au obţinut , din omogenatele de ficat şi inimă de şobolan, 3—4 fracţiuni care migrează spre anod şi au activitate transaminazică [5], [6]. Tot trei fracţiuni s-au obţinut şi prin cromatografiere şi recromatografiere pe CM-Sephadex [7].

Se ştie că serul uman normal prezintă la electroforeză o singură bandă cu activitate transaminazică. Or, Block şi colab. [8] au reuşit să separe din serul concentrat, prin electroforeză în amidon şi colorare directă pe placă, două fracţiuni cu migrare spre anod, cu activitate transaminazică, iar prin eluţie şi metode fotometrice cantitative, trei fracţiuni cu migrare spre anod şi activitate transaminazică.

Dat fiind eterogenitatea transaminazei aspartice din citoplasmă şi din serul sanguin, ne-am propus să evidenţiem eventuala eterogenitate a izoenzimei mitocondriale.

În acest scop am aplicat la determinarea activității enzimatice o metodă cantitativă mai fină decît colorarea directă și am concentrat eluatele de pe electroforegramele în agar ale preparatului mitocondrial. Am caracterizat fracțiunile prin comportare la două pH-uri și prin reacția cu antiseruri omologe și eterologe, deoarece migrarea electroforetică nu este un indice suficient pentru diferențierea izoenzimelor transaminazice, mitocondrială și citoplasmatică.

MATERIAL ȘI METODE

1. *Obținerea transaminazelor aspartice din mitocondrii și citoplasmă.* S-a lucrat pe șobolani albi, sacrificați prin decapitare. Din ficatul îndepărtat imediat s-au separat formațiunile intracelulare, după metoda Hogeboom [9]. Mitocondriile s-au spălat de 3—4 ori prin reomogenizare. Final, s-au reomogenizat cu apă distilată și s-au înghețat și dezghețat de 3—4 ori. S-au centrifugat 30 min la 14 000 g. Supernatantul, care conține transaminaza din mitocondrii, a fost concentrat prin ultrafiltrare și s-a întrebuințat proaspăt sau liofilizat. Soluția proaspătă a fost întrebuințată la electroforeză, iar materialul liofilizat la injectarea iepurilor.

Supernatantul obținut după separarea mitocondriilor s-a centrifugat din nou 60 min la 105 000 g. Supernatantul, care conține transaminaza din citoplasmă, a fost concentrat prin ultrafiltrare, dializat și s-a întrebuințat proaspăt sau liofilizat.

2. *Prepararea antiserurilor.* Preparatele enzimatice liofilizate s-au reluat în soluție salină și s-au administrat cu adjuvant Freund, subcutan, la iepuri, cîte 80—90 mg de animal, repartizate în doze de 10, 25, 35 mg la intervale de 12—15 zile și o singură doză de 20 mg după o lună. Iepurii s-au sîngerat după 10 zile de la ultima injecție. S-au întrebuințat 2—3 iepuri pentru fiecare antigen.

3. *Separarea izoenzimelor prin electroforeza în agar.* Procentul de proteină al preparatelor liofilizate a variat între 30—40% pentru mitocondrii și 40—60% pentru citoplasmă. Electroforeza în gel de agar a ambelor preparate s-a practicat după micrometoda Scheidegger [10], în tampon veronal/veronal sodic de pH 8,6, puterea ionică a tamponului fiind 0,05 în cuvă și 0,017 în plăci. Potențialul a fost de 22,5 V/cm și intensitatea 1 mA/cm; durata migrării a fost de 2,5 ore, la temperatura camerei. În șanț s-a introdus proteină proaspătă sau liofilizată și reluată în soluție tampon, în concentrație de 6%, în părți egale cu agar. S-a tăiat în lungime 1/4 din gelul de agar, care s-a colorat cu amidoschwarz. Cealaltă parte s-a tăiat în 8 fracțiuni de cîte 7 mm grosime, numerotate 1—8 de la anod spre catod. Fiecare fracțiune s-a mărunțit și s-a eluat în ser fiziologic. Cantitatea de eluant a variat la fiecare fracțiune între 2 și 4 ml, după activitatea enzimei, stabilită prin determinări prealabile. Pentru stabilirea curbei din figura 1, s-au tăiat fracțiuni de 2 mm grosime, începînd de la anod spre catod. Prelucrarea s-a făcut ca la fracțiunile de 7 mm. Pentru o probă am pus la eluție, într-o eprubetă, 3—4 fracțiuni similare.

Determinarea enzimei. S-a întrebuințat metoda Tonhazi [11] și rezultatele s-au exprimat în μg piruvat. Curba etalon s-a stabilit cu piruvat de sodiu. În probele cu ser antienzimatic s-au întrebuințat 0,5 ml soluție de enzimă și 0,5 ml antiser. Probele de control au conținut 0,5 ml ser normal de iepure. S-a constatat că serul normal nu inhibă activitatea enzimatică.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Forme multiple ale transaminazei din citoplasmă. Inițial a trebuit să verificăm dacă prin electroforeza în agar a citoplasmei se obțin tot 3 fracțiuni cu activitate transaminazică de tip „citoplasmă" , ca la electroforeza în amidon a omogenatului total. Lucrările prin care s-a urmărit distribuția transaminazelor aspartice pe formațiunile intracelulare au semnalat cîte o singură enzimă pe cele două formațiuni [12], [13], [14].

Am efectuat electroforeza în agar a preparatelor atît proaspete, cît și liofilizate. Rezultatele din figura 1 indică 3 fracțiuni cu activitate enzimatică. Valorile date în figură sînt de la o singură determinare ; am obținut și probe

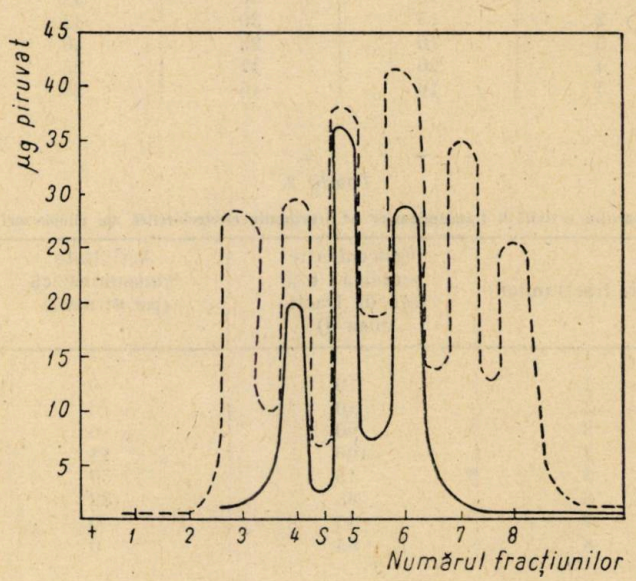


Fig.1. — Repartiția activității transaminazice pe fracțiunile electroforetice ale citoplasmei și extractului mitocondrial.
——— citoplasmă.
– – – – extract mitocondrial.
Fracțiunile numerotate de la anod spre catod.

la care valoarea fracțiunii 6 a fost mai mare decît a fracțiunii 5 (tabela 1). Întotdeauna însă fracțiunea 4 a avut o valcare mult mai mică. Eluatele fracțiunilor de pe o singură placă nu au avut activitate decît pe fracțiunile 5 și 6. Nu am obținut nici o deosebire între preparatele proaspete și cele liofilizate. Se remarcă în mod deosebit că, pe preparatele citoplasmatice, două izoenzime s-au etalat la catod. Poziția catodică a celor două izoenzime se explică prin faptul că, în gelurile de agar, curentul de electroendosmoză este mare. De asemenea, nu s-a obținut o concordanță între concentrația proteică a fracțiunilor și activitatea enzimatică (tabela 2). Procentele fracțiunilor proteice din tabela 2 s-au raportat la fracțiunea 4, cu concentrația

cea mai mare. Separarea prin electroforeză în agar a citoplasmei demonstrează și ea prezența celor trei forme multiple ale enzimei citoplasmatice.

Dependența reacțiilor enzimatice de pH. Izoenzimele transaminazice cunoscute, din mitocondrii și din supernatant, se pot caracteriza după com-

Tabela 1

Activitatea transaminazei aspartice din eluatele fracțiunilor electroforetice ale citoplasmei (în μg piruvat)

Nr. probei	Nr. fracțiunilor		
	4	5	6
1	18	50	32
2	15	30	42
3	10	26	48
4	20	37	28
5	16	46	26

Tabela 2

Repartiția activității transaminazice pe fracțiunile electroforetice ale citoplasmei

Nr. fracțiunilor	Concentrație proteică (% față de fracțiunea 4)	Activitate transaminazică (μg piruvat)
1	10	0
2	40	0
3	90	0
4	100	18
5	75	50
6	85	32
7	35	0
8	65	0

portarea lor la două pH-uri deosebite, 5,5 și 7,6 [1], [2]. Enzima mitocondrială nu este afectată de modificarea pH-ului optim 7,6, pe cînd enzima citoplasmatică are o activitate mult mai mică la pH 5,5 decît la pH 7,6. Pentru a controla eventuala prezență a izoenzimei mitocondriale în citoplasmă, care să explice prezența activității pe trei fracțiuni, am determinat activitatea enzimatică a celor trei fracțiuni la două pH-uri deosebite. Acest control a fost absolut necesar, deoarece rezultatele obținute doar prin analiză electroforetică [5], [7], [8] nu au fost verificate prin nici un alt parametru, mai ales că s-a lucrat cu extracte totale care conțin ambele izoenzime.

Din tabela 3 reiese limpede că comportarea la două pH-uri a celor trei enzime este identică, adică de tipul enzimei citoplasmatice.

Titrarea transaminazelor din citoplasmă cu antiserurile omolog și eterolog. Cercetările efectuate cu seruri antitransaminazice au demonstrat specificitatea de formațiune a fiecărei izoenzime [4], [15]. Pentru a verifica

rezultatele obținute prin comportare la două pH-uri, am făcut determinări și în prezența antiserurilor omolog și eterolog. Rezultatele din tabela 4 confirmă, prin inhibiția aproape totală cu serul omolog și aproape nulă cu serul eterolog, existența unor forme multiple ale enzimei în citoplasmă.

Forme multiple ale transaminazei din mitocondrii. Am efectuat electroforeza în agar a preparatelor atît proaspete cît și liofilizate.

Tabela 3

Dependența de pH a transaminazelor din citoplasmă și mitocondrii

Transaminaza		Activitate în μg piruvat	
		pH 7,6	pH 5,5
Citoplasmă			
Fracțiunea	4	16	3
,,	5	46	17
,,	6	29	12
Mitocondrii			
Fracțiunea	3	27	25
,,	4	29	25
,,	5	36	31
,,	6	43	40
,,	7	35	30
,,	8	26	22

Tabela 4

Activitatea transaminazelor citoplasmatice și mitocondriale în prezența antiserurilor omolog și eterolog

Transaminaza		% activitate rămasă	
		ser anticitoplasmă	ser antimitocondrii
Citoplasmă			
Fracțiunea	4	20	90
,,	5	20	100
,,	6	15	90
Mitocondrii			
Fracțiunea	3	90	20
,,	4	90	10
,,	5	80	10
,,	6	100	20
,,	7	100	20
,,	8	90	10

Rezultatele din figura 1 indică un număr de 6 fracțiuni cu activitate enzimatică, dar separarea între fracțiuni nu este netă, deoarece există o activitate redusă și între maxime. Valorile date în figură sînt media a 5 determinări, deoarece raportul valorilor nu variază de la preparat la preparat, așa cum este cazul enzimei citoplasmatice. Preparatele liofilizate nu și-au păstrat activitatea enzimatică mai mult de 2—3 săptămîni.

Pe preparatul mitocondrial, activitatea transaminazică s-a etalat aproape pe toată placa, atît spre anod cît și spre catod. În acest caz, migrarea electroforetică nu a putut fi singură un indiciu sigur al existenței formelor

multiple. Ca și la preparatul din supernatant, nu s-a obținut o concordanță între concentrațiile proteice ale fracțiunilor și activitatea enzimatică (tabela 5).

Tabela 5

Repartiția activității transaminazice pe fracțiunile electroforetice ale mitocondriilor

Nr. fracțiunilor	Concentrația proteică (% față de fracțiunea 4)	Activitate transaminazică (μg piruvat)
1	10	0
2	20	0
3	40	27
4	100	29
5	70	37
6	50	42
7	20	35
8	10	25

Am obținut un număr de 6 fracțiuni cu activitate transaminazică, fapt nesemnalat încă în literatură pentru transaminaza mitocondrială. Este anunțată posibilitatea obținerii unor forme multiple și pentru enzima mitocondrială, dar nu sînt publicate rezultate concrete [7].

Dependența reacțiilor enzimatice de pH. Pentru a verifica eventuala impurificare a mitocondriilor cu citoplasmă, care să explice prezența formelor cu migrare spre anod, am determinat și în acest caz activitatea la două pH-uri deosebite. Din tabela 3 se constată că toate cele 6 fracțiuni au aceeași comportare, neinfluențată de modificarea pH-ului, indiciu caracteristic enzimei mitocondriale.

Titrarea transaminazelor din mitocondrii cu antiserurile omolog și eterolog. Rezultatele din tabela 4 confirmă, prin inhibiția aproape totală cu serul omolog și aproape nulă cu serul eterolog, existența formelor multiple ale enzimei mitocondriale.

Rezultatele obținute pentru izoenzima mitocondrială pot indica existența reală a formelor multiple, dar pot să reflecte și o prindere și antrenare a transaminazei mitocondriale pe mai multe fracțiuni proteice, deoarece preparatul întrebuințat cuprinde toate proteinele solubile extrase din mitocondrii.

Un argument pentru existența formelor multiple ale transaminazei din mitocondrii este și existența izoenzimei mitocondriale a malatdehidrogenazei în 5—6 forme. Or, această enzimă are aceeași repartiție intra- și extramitocondrială ca și transaminazele aspartice [16], [17], [18]. Fie că reprezintă doar o antrenare pe fracțiuni deosebite, sau că diferă doar prin cantitatea de acid sialic, sau prin alte resturi prinse pe aceeași proteină [15], [19], bazele moleculare ale acestei microeterogenități a izoenzimelor mitocondriale sînt necunoscute. Într-un sens mai larg, însăși semnificația biologică a izoenzimelor este necunoscută (20). Fracționarea izoenzimelor transaminazice se poate realiza deci și prin electroforeză în agar, fiind necesară însă o concentrare a preparatelor și întrebuințarea

unor metode de determinare mai fine. În acest fel se poate renunța la o purificare prealabilă și la cromatografieri și recromatografieri pe coloană de schimbători de ioni.

CONCLUZII

Rezultatele determinărilor de activitate transaminazică efectuate asupra eluatelor din gelul de agar al proteinelor solubile obținute din mitocondriile și citoplasma celulelor ficatului de șobolan permit să se tragă următoarele concluzii :

1. În eluatele concentrate de citoplasmă se găsesc trei fracțiuni cu activitate transaminazică, puse în evidență prin analiza electroforetică în agar.

2. Variația activității acestor trei izoenzime la două pH-uri și reacția lor cu serurile omolog și eterolog demonstrează că ele sînt de natură citoplasmatică.

3. În eluatele concentrate de extract mitocondrial se găsesc șase fracțiuni cu activitate transaminazică, puse în evidență prin analiza electroforetică în agar.

4. Activitatea invariabilă a acestor șase izoenzime la două pH-uri deosebite și reacția lor cu serurile omolog și eterolog demonstrează că ele sînt de natură mitocondrială.

5. Mijloacele necesare pentru evidențierea formelor multiple au fost concetrarea eluatelor fracțiunilor electroforetice și determinarea activității enzimatice printr-o metodă cantitativă fină.

Prezentată la redacție
la 1 octombrie 1967

Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România
București

BIBLIOGRAFIE

1. G. A. Fleisher, C. S. Potter, K. G. Wakim, *Separation of two glutamic oxal-acetic transaminases by paper electrophoresis*, Proc. Soc. exp. Biol., N.Y., **103**, 229 (1960).
2. J.W. Boyd, *The intracellular distribution, latency and electrophoretic mobility of L-glutamate-oxalacetate transaminase from rat liver*, Biochem. J., **81**, 434 (1961).
3. P. Borst, E. M. Peeters, *The intracellular localization of glutamate-oxaloacetate transaminases in heart*, Biochim. Biophys. Acta, **54**, 188 (1961).
4. J. S. Nisselbaum, O. Bodansky, *Immunochemical and kinetic properties of anionic and cationic glutamic-oxaloacetic transaminases separated from human heart and human liver*, J. biol. Chem., **239**, 4232 (1964).
5. L. E. Decker, E. M. Rau, *Multiple forms of glutamic-oxalacetic transaminase in tissues*, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., **112**, 144 (1963).
6. K. Yamada, S. Sawaki, A. Fukumura, M. Hayashi, *Isoenzymes of transaminase in rat tissues*, J. Vitaminology, **8**, 286 (1962).
7. M. Martinez-Carrion, F. Riva, C. Turano, P. Fasella, *Multiple forms of supernatant glutamate-aspartate transaminase from pig heart*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **20**, 206 (1965).
8. W. D. Block, R. Carmichael, C. E. Jackson, *Quantitative determination of isoenzymes of GOT in human serum*, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., **115**, 941 (1964).
9. G. H. Hogeboom, *Fractionation of cell components of animal tissues*, în *Methods in enzymology*, sub red. S.P. Colowick, N. O. Kaplan, vol. I, Academic Press, New York, 1955, p. 16.

10. J. J. Scheidegger, *Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse*, Int. Arch. Allergy, **7**, 103 (1955).
11. N. E. Tonhazi, N. G. White, W.W. Umbreit, *A rapid method for the estimation of glutamic-aspartic transaminase in tissues and its application to radiation sickness*, Arch. Biochem. Biophys., **28**, 36 (1950).
12. H. J. Eichel, J. Bukovsky, *Intracellular distribution pattern of rat liver glutamic-oxalacetic transaminase*, Nature, **191**, 243 (1961).
13. P. Bandhuin, H. O. Beaufay, Y. Rahman-Li, Z. Sellinger, R. Wattiaux, P. Jacques, C. de Duve, *Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine amino-transferase, D-amino acid-oxidase and catalase in rat liver tissue*, Biochem. J., **92**, 179 (1964).
14. B. Sheid, H. P. Morris, J. S. Roth, *Distribution and activity of aspartate aminotransferase in some rapidly proliferating tissues*, J. biol. Chem., **240**, 3016 (1965).
15. Yoshimasa Morino, Hiroyuki Kagamiyama, Hiroshi Wada, *Immunochemical distinction between glutamic-oxaloacetic transaminases from the soluble and mitochondrial fractions of mammalian tissues*, J. biol. Chem., **239**, PC 943 (1964).
16. C. J. R. Thorne, L. I. Grossman, N. O. Kaplan, *Starch-gel electrophoresis of malate dehydrogenase*, Biochim. Biophys. Acta, **73**, 193 (1963).
17. G. B. Kitto, P. M. Wasserman, J. Michjede, N. O. Kaplan, *Multiple forms of mitochondrial malate dehydrogenases*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **22**, 75 (1966).
18. L. Siegel, S. Englard, *Beef-heart malic dehydrogenases. III. Comparative studies of some properties of M-malic dehydrogenase and S-malic dehydrogenase*, Biochim. Biophys. Acta, **64**, 101 (1962).
19. B. S. Blumberg, L. Warren, *The effect of sialidase on transferrins and other serum proteins*, Biochim. Biophys. Acta, **50**, 90 (1961).
20. E. Kun, P. Volfin, *Tissue specificity of malate dehydrogenase isoenzymes. Kinetic discrimination by oxaloacetate and its mono- and difluoro-analogues*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **22**, 187 (1966).

MULTIPLE FORMS OF MITOCHONDRIAL ASPARTIC ISOTRANSAMINASE FROM RAT LIVER

SUMMARY

As aspartic transaminase isoenzymes, intramitochondrial soluble proteins extracted by freezing-thawing and cell-sap from 105 000 g, were used.

Agar gel electrophoresis of cell-sap revealed three fractions with transaminasic activity. The cytoplasmatic nature of these three isoenzymes was shown both by their behaviour at two pH and their reaction with the homologous and heterologous sera.

By agar gel electrophoresis of mitochondrial water extract, six fractions with transaminasic activity were obtained. By reaction, both with homologous and heterologous sera and behaviour at two pH, the mitochondrial nature of these six fractions was established.

The concentration of both intracellular preparations and of eluates fractions from electrophoregrams brought forward the multiple forms of each isoenzyme. The possibility that these forms could be only an artefact, showing the reasons which are in favour of their actual existence, are discussed.

ST. CERC. BIOCHIM., II, 1, 83–85 (1968)

NOTE DE LABORATOR

UN PROCEDEU ÎMBUNĂTĂȚIT DE DEVELOPARE A IZOENZIMOGRAMELOR AMILAZICE

MARGARETA ELIAS

Rezumat. — Se descrie o metodă îmbunătățită a developării enzimogramelor amilazice, constînd în utilizarea unor plăci conținînd substratul inclus în gel preparate numai cu zece minute înainte de utilizarea lor în developarea plăcilor care conțin enzimele migrate electroforetic. Se creează astfel condiții mai bune pentru reacția hidrolitică catalizată de amilază. Mulțumită acestor condiții unele fracțiuni care nu sînt revelate pe plăcile uscate devin vizibile. Adeziunea mai bună între plăcile de migrare și de developare previne dezavantajele mecanice din procedeul clasic.

Un procedeu uzual de developare a diferitelor enzimograme obținute prin electroforeză pe gel este suprapunerea lor cu plăci de developare care conțin substratul specific enzimelor respective, dizolvat în gelul identic cu cel pe care are loc electroforeza. După reacția enzimatică, zonele izoenzimatice sînt puse în evidență prin colorarea lamei care conține substratul [3].

Un procedeu bazat pe acest principiu este descris în diferite lucrări [2], [4] pentru colorarea izoenzimogramelor amilazice din semințele de orz și din saliva și pancreasul unor animale.

În acest procedeu, plăcile de developare sînt preparate în prealabil și uscate, apoi sînt suprapuse peste plăcile electroforetice și legate împreună cu benzi de elastic, incubate și colorate.

Utilizînd procedeul indicat mai sus pentru colorarea izoenzimelor amilazice din Triticum sp., Secale cereale 2n și 4n și hibrizii interspecifici de tip Triticale, am obținut rezultate care s-au dovedit a fi susceptibile de ameliorare.

În scopul ameliorării imaginilor izoenzimatice amilazice am pornit de la premiza că amilazele fiind enzime din grupul hidrolazelor, procesul de amiloliză este dependent de cantitatea de apă din mediu [1]. Punerea în contact a fracțiilor enzimatice aflate în mediul de gel umed cu substratul lor în stare uscată nu constituie, probabil, condiția optimă pentru reacția enzimatică necesară developării fracțiilor separate electroforetic. În experiențele efectuate de noi am observat că fracțiile enzimatice cu același grad de rezoluție electroforetică pot fi evidențiate mai mult sau mai puțin pe placa de developare, la aceeași cantitate de enzimă și concentrație de substrat, în funcție de umiditatea mediului,

de temperatura şi timpul de incubare, ca şi de condiţiile mecanice ale procedeului.

Pentru ameliorarea condiţiilor de umiditate a mediului de reacţie, am modificat procedeul clasic folosind plăci de developare care conţin substratul în mediu umed, preparate în mod obişnuit, dar numai cu 10 minute înainte de a fi folosite. În felul acesta, pe lîngă modificarea cantităţii de apă din mediu, se permite enzimei să acţioneze nu numai pe suprafaţa lamei, ca în cazul preparatului uscat, dar şi în profunzimea gelului, pe lama umedă, pevenind astfel descompunerea zonelor care delimitează fracţiile izoenzimatice cu mobilităţi foarte apropiate (fig. 1).

În privinţa temperaturii şi timpului de incubare am constatat că la un timp mai îndelungat şi la o temperatură de incubare mai mare (1 oră la 45°—50° C) zonele nedescompuse care delimitează două fracţii pot dispare, iar cele două fracţii pot conflua. În aceleaşi condiţii, însă, pot apare pe placa de developare fracţii cu activitate enzimatică mai slabă, cu condiţia să nu aibă în vecinătatea lor alte fracţii, cu activitate mai puternică (fig. 2).

Timpul optim pe care l-am stabilit pentru developarea fracţiilor enzimatice din materialul analizat de noi este de 30 min la 45° C. Pentru developarea unor fracţii enzimatice cu activitate slabă, indicăm întrebuinţarea în alte repetiţii a unor temperaturi mai ridicate (45°—50° C) şi a unui timp de incubare mai lung. Atfel, se pot completa izoenzimogramele obţinute în condiţiile menajate menţionate mai sus.

Factorii mecanici care acţionează asupra plăcilor suprapuse joacă, de asemenea, un rol care nu poate fi neglijat. În cursul developărilor efectuate prin procedeul clasic am constatat că gelul de pe plăcile electroforetice are o rezistenţă mai mică la presiune : el se deplasează uşor şi crapă cînd enzimograma este legată cu elastic de placa de developare.

De asemenea, particulele fine de amidon dispersate uniform pe placa uscată se redistribuie în mod neregulat în contact cu placa umedă, împiedicînd evidenţierea clară a zonelor unde a avut loc o amiloliză slabă, ceea ce nu se întîmplă în procedeul modificat. În acest din urmă procedeu, aderenţa celor două lame de gel este bună şi nu necesită legarea lor cu elastic. Pentru a asigura o mai mare stabilitate a plăcilor în timpul incubării, recomandăm pentru electroforeză plăci ceva mai mari decît cele folosite pentru developare.

Pentru electroforeză se foloseşte extrasul apos al seminţelor de cereale, obţinut după 5—10 zile de la începutul germinării, prin presarea boabelor şi centrifugarea timp de 10 minute, la 5 °C şi la 12 000 turaţii/min. Electroforeza se efectuează la temperatura de 5—8 °C, în tampon fosfat pH 7,3 şi putere ionică 0,02. Pentru plăcile de migrare se foloseşte 1% agar în acelaşi tampon, dar cu putere ionică 0,006. Potenţialul este de 8 volţi/cm şi intensitate 0,9 mA/cm. Durata migrării este de o oră şi 45 minute. Pentru plăcile de developare se foloseşte 1% agar Difco, care conţine 0,5% amidon hidrolizat Smithies.

Modul de developare a enzimogramelor este singura etapă modificată în procedeul nou. Astfel, în timp ce în procedeul vechi se folosesc plăci de developare uscate, preparate în prealabil, în procedeul nou plăcile de developare sînt preparate numai cu 10 minute înainte de întrebuinţarea lor. De asemenea, contactul între placa de electroforeză şi cea

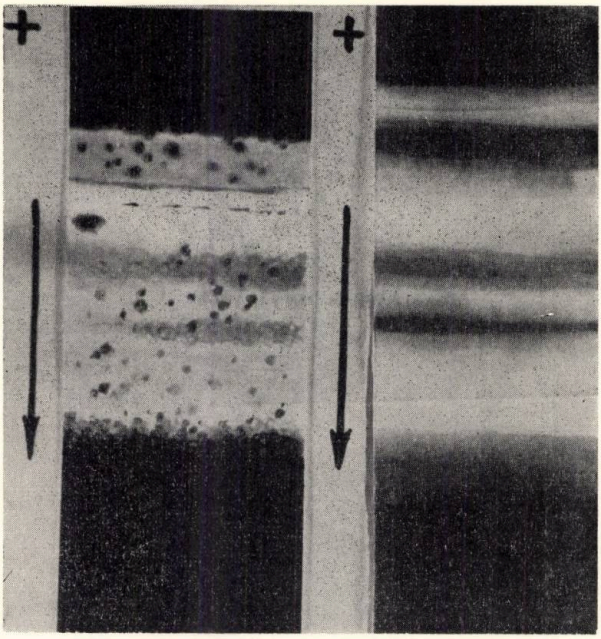


Fig. 1. — Ameliorarea developării enzimogramei amilazice prin utilizarea plăcilor de developare umede.

Stînga: izoenzimograma amilazei din *T. durum* developată prin contact cu placa de developare uscată,

Dreapta: izoenzimograma amilazei din *T. durum* developată prin contact cu placă de developare umedă.

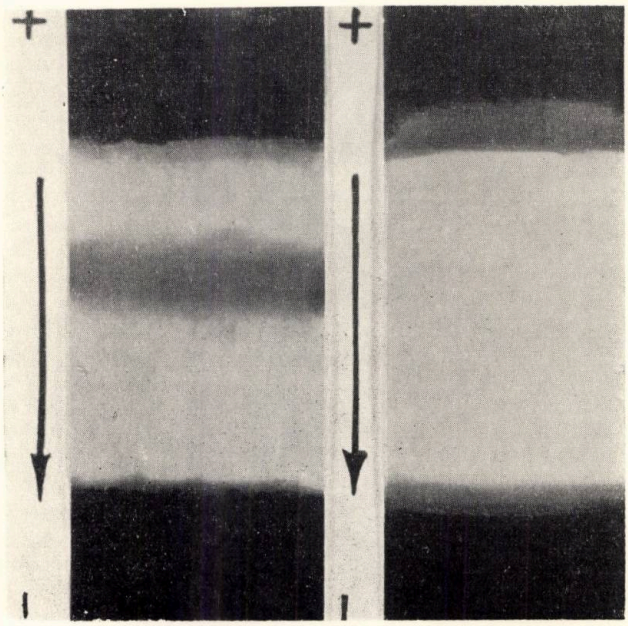


Fig. 2. — Influența temperaturii și a timpului de incubare asupra developării enzimogramelor amilazice.

Stînga: izoenzimograma amilazei din *S. cereale* developată timp de 30 min la 45° C.

Dreapta, izoenzimograma amilazei din *S. cereale* developată timp de 1 oră la 45°—50° C.

de developare se realizează prin legare cu elastic în procedeul vechi, dar prin simpla suprapunere în procedeul nou. În privința temperaturii și timpului de încubare el variază între 30—45° C și 30—45 minute în procedeul vechi, în funcție de materialul biologic folosit. În cazul semințelor cerealelor analizate de noi, condiția optimă de developare a fost de 30 minute la 45° C. Colorarea lamelor se face prin imersarea lor timp de cîteva secunde în soluție de 0,3% iod în soluție de 3% iodură de potasiu în apă.

Prezentat la redacție la 22 iulie 1967

Institutul de biologie Traian Săvulescu București
Secția de genetică

BIBLIOGRAFIE

1. R. Drapon, A. Guilbot, *Evolution de l'alpha amylase en fonction de l'activité de l'eau du milieu* Die Stärke, **14**, 449—455 (1962).
2. O. Frydberg, G. Nielssen, *Amylase isozymes in germinated seeds*, Hereditas, **54**, 123—140 (1965).
3. C. L. Markert, F. Moller, *Multiple forms of enzymes : tissue, ontogenetic and species specific patterns*, Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **45**, 753—763 (1959).
4. K. Sick, J. T. Nielsen, *Genetics of amylase isozymes in the mouse*, Hereditas., **51**, 291 (1964).

AN IMPROVED METHOD FOR THE DEVELOPMENT OF THE AMYLASE ZYMOGRAMS

SUMMARY

An improvement of the amylase-zymograms development method is reported, consis ting in the utilization of wet slides containing the substratum included in the gel, 1 minutes only prior to their utilization in the development of the electrophoretically-migrated enzymes-containing slides. Thus, better conditions are available for the amylase-catalysed hydrolytic reaction. Thanks to this improvement, fractions which cannot be revealed on dry slides become visible. The better adhesion between migration and development slides prevents the mechanical disadvantages which occur in the classical procedure.

VICTOR GHEȚIE și VALERIU MICUȘAN, *Analiza imunochimică* (Teorie și practică), Edit. Academiei, București, 1966, 368 p., 108 fig., 134 tabele.

Cartea este împărțită în trei părți : „Antigenul", „Anticorpul" și „Reacția antigen-anticorp".

Autorii abordează fiecare capitol al acestei cărți atît sub raport teoretic, cît și în aspectele sale practice, în sensul unei minuțioase informări a cititorului. Așa, de exemplu, noțiunea de antigenicitate este prezentată sub raportul structurii moleculare, al naturii sale chimice, al specificității în reacția imunologică, respectiv al „recunoașterii" sale pe acest criteriu. Punerea în evidență a determinanților antigenici face posibilă adîncirea investigațiilor structurale chiar sub nivel molecular. Determinismul genetic al structurilor antigenice face ca analiza imunochimică să deschidă o poartă relativ comodă către investigarea informației genetice prin expresia sa fenotipică directă, la nivel molecular și submolecular. Discutînd specificitatea de specie, de organ sau de funcție în organism a unor antigene, autorii cuprind un însemnat cîmp de cercetare, bogat în sugestii. Capitolul tratează pe larg prepararea antigenelor — izolare, purificare, concentrare — și controlul acestor operații, inclusiv metodele de determinare cantitativă a substanțelor antigenice de natură proteică sau polizaharidică. Autorii pun un deosebit accent pe necesitatea purificării antigenelor utilizate în imunizare, căci valoarea interpretativă a serului imun obținut este strîns legată de acestea.

Capitolul privitor la anticorpi este tratat după aceeași schemă ca cel anterior, autorii folosind o informație la zi privitoare la structura anticorpilor, la eterogenitatea lor, la locul lor de formare și la condițiile de imunizare și hiperimunizare a animalelor de experiență. Abordarea și tratarea teoretică și practică a acestui capitol sînt complete, cititorul fiind minuțios instruit pentru a înțelege deosebita însemnătate a anticorpilor ca reactivi cu putere de discernămînt de mare finețe în reacțiile imunochimice. Sînt expuse și metode de izolare și purificare a anticorpilor, toate menite să dea cercetătorului o instrumentație sigură în investigațiile sale.

Un spațiu important al volumului este destinat reacției antigen-anticorp și metodelor practice de lucru în imunochimie, care utilizează anticorpii precipitanți sau numai blocanți.

Pentru recunoașterea și cercetarea antigenelor și a anticorpilor din soluții sînt descrise procedeele de precipitare imună prin difuzie în gel (Ouchterlony) sau după electroforeză (imunoelectroforeza).

Pentru recunoașterea antigenelor sau a anticorpilor în țesuturi, respectiv în celule, un capitol tratează procedeele de imunofluorescență, îndeosebi metodele de cuplare a anticorpilor sau a unor antigene cu substanțe fluorescente.

Prin acest mod de trecere în revistă — pe capitole — a conținutului volumului *Analiza imunochimică*, am dorit să subliniem că autorii au gîndit și au realizat, într-o logică foarte strînsă, întreg procesul de instruire pe care trebuie să-l parcurgă cercetătorul care dorește să recurgă la mijloacele de investigare prin metode imunologice. De altfel, ar fi poate mai corect să spunem că mulți cititori vor deveni cercetători tocmai după citirea acestei cărți căci nu puțini vor fi aceia care, în bogatul material prezentat de autori, vor găsi pe de o parte, explicații pentru observații neînțelese pînă acum, iar pe de altă parte sugestii, inclusiv metode, pentru investigații viitoare. Cartea va fi utilă și cercetătorilor deja antrenați în unele investigații prin metode imunochimice, căci autorii prezintă o bibliografie vastă, sistematizată pe capitole și triată critic și cu competență.

Redactarea cărții este făcută într-un stil foarte clar, ilustrînd perfecta stăpînire de către autori a materialului tratat, ca și experiența lor practică. Faptul că autorii își sprijină redactarea pe experiența și cercetările lor directe le-a dat posibilitatea ca, într-un stil concis, să redea faptele cu gradul de certitudine cîștigat pînă acum, să indice rezervele ce pot fi formulate și printre rînduri, să dea multe sugestii. Aceste sugestii conturează de fapt o viziune largă a cercetărilor viitoare, autorii asigurîndu-și anticipat meritul de a face, prin volumul intitulat restrictiv *Analiza imunochimică*, o școală de multilaterale cercetări și de orientare a acestora. Beneficiarii vor fi sectoare largi ale medicinii (umană și veterinară), ale biologiei generale, ale geneticii moleculare și multe altele.

Se înțelege că lectura volumului *Analiza imunochimică* se recomandă tuturor celor care lucrează în sectoarele de mai sus sau care se pregătesc pentru aceste activități, cartea avînd și un foarte pronunțat caracter didactic. Ca unul din cititorii inițiați și cu oarecare experiență în probleme de imunochimie, mărturisesc că am parcurs conținutul lucrării cu un substanțial profit, fapt pentru care păstrez autorilor recunoștință.

N. St. Chișiu
Spitalul „Dr. I. Cantacuzino", București

E. C. SLATER, Z. KANIUGA și L. WOJTCZAK, *Biochemistry of Mitochondria* (Biochimia mitocondriilor), Academic Press, London ; Polish Scientific Publishers, Warszawa, 1967, 122 p.

În ultimii ani s-a acordat o atenție din ce în ce mai mare mitocondriei și rolului ei în economia celulei. În cadrul celei de-a 3-a Intruniri a Federației societăților europene de biochimie (FEBS), care a avut loc la Varșovia în aprilie 1966, s-a ținut un colocviu cu tema *Biochimia mitocondriilor*. Volumul de față este rezultatul acestei manifestări științifice. Cele șapte referate din cadrul acestui colocviu, tratînd probleme majore privind structura lanțului respirator și mecanismul fosforilării oxidative, au fost prezentate de autorități recunoscute în acest domeniu, atît în Europa, cît și din Statele Unite. Fiecare referat cuprinde rezultatele unor cercetări întreprinse de autor și de colaboratorii săi într-o anumită direcție.

Primul capitol cuprinde cuvîntul de deschidere a colocviului, rostit de prof. E. C. Slater de la Universitatea din Amsterdam. Autorul remarcă, printre altele, că sîntem încă departe de a putea înțelege pe deplin mecanismul fosforilării oxidative cu toate că informațiile despre lanțul respirator și fosforilarea oxidativă se înmulțesc necontenit. Lanțul respirator însuși apare mult mai complex decît ar fi necesar potrivit teoriilor actuale cu privire la mecanismul fosforilării oxidative.

Dr.M. Klingenberg a contribuit la acest colocviu prin prezentarea unor studii detaliate privind rolul ubichinonei în lanțul respirator. Autorul aduce dovezi foarte convingătoare că întregul *pool* de ubichinonă din mitocondrii participă în mod obligatoriu la transferul echivalenților reducători prin lanțul respirator, contrar părerii altor autori, după care ubichinona s-ar afla în totalitate, sau numai în parte, pe o ramificație facultativă a lanțului respirator. M. Klingenberg emite ipoteza deosebit de interesantă că ubichinona ar reprezenta un colector de electroni de la diversele dehidrogenaze flavinice.

Capitolul al treilea, „Secvența reacțiilor în fosforilarea oxidativă", semnat de prof L. Ernster, dr. C. P. Lee și dr. S. Janda, cuprinde o serie de studii privind reacția de transhidrogenare dintre NADH și NADP+ precum și efectele aurovertinei și arsenatului asupra fosforilării oxidative. După părerea autorilor, aceste cercetări vin în sprijinul teoriei chimice a fosforilării oxidative, confirmînd existența ipoteticului intermediar „X ~ Y".

În articolul semnat de prof. P. Mitchell și dr. J. Moyle *Cuplarea fosforilării cu transportul de protoni : unele verificări experimentale*, se discută ipoteza chemiosmotică a fosforilării oxidative, care a fost emisă în 1954 de Lundegardh și dezvoltată cîțiva ani mai tîrziu de P. Mitchell. Autorii prezintă experiențe care ar demonstra existența unui transfer de protoni din interiorul mitocondriei spre exterior, în timpul funcționării lanțului respirator, verificînd astfel unul din cele patru postulate ale ipotezei chemiosmotice.

Informații interesante privind transportul ionilor prin membrane oferă articolul *Permeabilitatea membranei mitocondriale pentru anioni și cationi*, semnat de dr. J. B. Chappell și dr. K. N. Haarhoff. Urmărind modificările de volum ale mitocondriilor în prezență de diferite săruri, autorii stabilesc o serie de relații între sarcina și volumul ionilor, pe de o parte, și capacitatea lor de a străbate membrana mitocondrială, pe de altă parte.

Prof. B. Chance, în lucrarea *Măsurarea pH-ului intramitocondrial*, prezintă o tehnică ingenioasă pentru determinarea pH-ului în camera internă a mitocondriilor, bazată pe urmărirea spectrofotometrică a variațiilor de culoare a albastrului de bromtimol, care se fixează selectiv pe cristele mitocondriale. Cu ajutorul acestei tehnici deosebit de fine, B. Chance nu a putut corela modificările pH-ului intramitocondrial cu transferul de electroni sau de hidrogen prin lanțul respirator, după cum prevede ipoteza chemiosmotică a lui P. Mitchell.

Impermeabilitatea membranei mitocondriale pentru NADH face dificilă înțelegerea modului în care celula hepatică, ca și alte tipuri de celule animale, integrează diversele funcții mitocondriale și citoplasmatice. Referatul profesorului H. A. Krebs, *Geneza agentului reducător în mitocondrii*, răspunde tocmai acestei chestiuni : cuplul malat-oxaloacetat este cărăușul echivalenților reducători din citoplasmă în mitocondrii și viceversa. În timpul glucogenezei din piruvat, NADH-ul necesar inversării reacției gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazei este generat în mitocondrii prin oxidarea unei porțiuni din piruvat, fiind apoi transferat în citoplasmă prin intermediul navetei malat-oxaloacetat. Același cuplu transportă NADH-ul în sens invers, cînd celula metabolizează aerob glucoză.

Înalta ținută științifică a lucrărilor prezentate la acest colocviu și condițiile grafice excelente în care ele au apărut fac ca acest volum să fie deosebit de util cercetătorilor care lucrează în acest domeniu. Este mai puțin de recomandat celor care vor să se informeze rapid în problemele mecanismului fosforilării oxidative.

Elena Cristea
Laboratorul de chimie biologică I.M.F.
București

H.W. GOEDDE, A. DOENICKE și K. ATLAND, *Pseudocholinesterasen. Pharmakogenetic Biochemie, Klinik* (Pseudocolinesterazele. Farmacogenetică, biochimie, clinică), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1967, 271, 141 fig., 55 tabele, 505 trimiteri bibliografice.

Această carte apare la momentul oportun și împlinește o bine simțită necesitate, adunînd într-un volum, în spirit critic, numeroase date privind aspectele farmacogenetice, biochimice și clinice ale acestei enzime.

Lucrarea este concepută în trei părți.

Partea întîi cuprinde 11 capitole, este redactată de dr. H. W. Goedde în colaborare cu dr. A. Doenicke și profilată pe problemele legate de farmacogenetică și biochimie.

Capitolul I definește, delimitează și descrie unele clase de esteraze : arilesteraze, carboxilesteraze, lipaze, atropinesteraze și colinesteraze.

Capitolul al II-lea este consacrat pseudocolinesterazei normale. Se descriu proprietățile fizice și chimice ale enzimei, substratele, fracțiunile serice active, cercetări asupra rolului fiziologic, studii histochimice, specificitatea de substrat, inhibitorii, activatorii și reactivatorii reacției enzimatice.

Capitolul al III-lea este un capitol de metodică, în care se arată principiile de lucru pentru măsurarea activității enzimatice și a inhibiției competitive și necompetitive, realizarea preparatelor histochimice, prelucrarea electroforetică, cromatografia pe schimbători de ioni și gel filtrarea.

Capitolele IV și V analizează două variante anormale ale pseudocolinesterazei, cunoscute sub numele de „dibucain" și respectiv „fluor rezistente", urmărindu-se diferențierea acestor variante față de enzima normală. Se descriu lucrări de genetică formală și cercetări asupra unor populații genetice diferite.

Capitolul al VI-lea se ocupă de dirijarea genetică a variantelor, cu descrierea a două cazuri ipotetice, calculate genetic.

Capitolele VII, VIII și IX se ocupă de componenta C_5 și cercetarea modelelor formal genetice ale pseudocolinesterazei, precum și de aplicațiile determinării variantelor pseudocolinesterazei.

Capitolul al X-lea înfățișează comparativ activitatea, specificitatea și variabilitatea enzimatică a serumproteinelor la diferite specii,sub aspect genetic și filogenetic, ocupîndu-se de transferine, pe de o parte, și de esteraze — în speță atropinesteraze și colinesteraze —, pe de altă parte.

Capitolul al XI-lea dezvoltă probleme legate de reactivitatea enzimatică în raport cu substratul și inhibitorul, cu studii asupra centrului activ al enzim-proteinei. Se arată rezultatele blocării chimice a centrului activ cu DFP, cu formarea complexului inactivat enzimă-substrat-inhibitor și determinarea biologică a centrului activ; se descrie de asemenea mecanismul de rupere a esterilor, mecanismul inhibiției, precum și cel de reactivare a reacției enzimatice.

Partea a doua, redactată de dr. K. Atland, este consacrată aspectelor clinice ale pseudocolinesterazei și cuprinde două capitole. Astfel, în capitolul al XII-lea se descriu modificările activității pseudocolinesterazei în diferite afecțiuni de tip hepatic, infarct miocardic, reacție anafilactică, șocuri postoperatorii etc. și studiile morfologice și histochimice ale celulei hepatice; se arată importanța determinării activității pseudocolinsterazei serice pentru diagnostic și prognostic, cu descrierea a două metode clinice de determinare a activității enzimatice (metoda Kalow și testul hîrtiei de pH), cu prezentarea rezultatelor calculate statistic.

Capitolul al XIII-lea se ocupă de problemele legate de importanța activității pseudocolinesterazei serice, în raport cu anestezia, legat de efectul acetilcolinei și succinilcolinei asupra fibrelor musculare; se prezintă și un studiu asupra hidrolizei succinilcolinei, a legăturilor proteină-succinilcolină. Se analizează cazurile de apnee prelungită, survenită la tratamentul cu succinilcolină al bolnavilor hepatici și al indivizilor cu pseudocolinesterază atipică, precum și comportarea diferită a activității pseudocolinesterazei serice la unele narcotice.

Partea a treia, intitulată „Descrierea metodelor de lucru", prezintă un prețios material practic, fiind detaliate tehnicile de identificare, dozare și purificare a enzimei, și anume: măsurarea activității; determinarea unor constante, ca numărul de dibucaină, de fluor; testul Kalow; difuzia în gel de agar; determinarea clinică rapidă a tipului de enzimă; testul hîrtiei de pH (acoltest); electroforeza pe gel de amidon; gel filtrarea; imunoabsorbția; imunoelectroforeza; imunodifuzia după Ouchterlony; separarea prin cromatografie pe coloană; metode de obținere și purificare a enzimei.

Volumul „*Pseudocholinesterasen*" nu este numai o monografie completă asupra cunoștințelor actuale privind cercetările legate de pseudocolinesterază, ci stimulează explorarea unor noi aspecte ale acestei probleme, sub raport farmacogenetic, biochimic și clinic. De asemenea, lucrarea este de un prețios ajutor celor interesați, prin descrierea metodelor de investigație clasice

şi moderne, în mare parte verificate în practica de laborator a autorilor. Cartea consemnează astfel şi rezultatul unor experienţe directe, efectuate de autorii : dr. H. W. Goedde şi dr. A. Doenicke, specializaţi în biochimia şi genetica umană, şi dr. K. Atland, specialist în anestezie şi chirurgie.

Stela Gheție
Catedra de biochimie I.M.F.,
București

Techniques in protein biosynthesis (Tehnici în biosinteza proteinelor), sub red. P. M. Campbell şi J. R. Sargent, vol. I, Academic Press.

Marile progrese înregistrate de biochimie în ultimii ani se datoresc în mare măsură elucidării unor aspecte legate de biosinteza proteinelor.

Constituenţi esenţiali ai organismelor vii, direct specificate de mesajul genetic, proteinele şi sinteza lor reprezintă un subiect pasionant de cercetare, ţintind spre abordarea fenomenelor vitale în cele mai intime detalii ale lor.

Iată de ce Academic Press a publicat de curînd volumul *Techniques in Protein Biosynthesis*, sub redacţia lui P. M. Campbell şi J. R. Sargent.

Lucrarea este împărţită în cinci capitole, redactate de personalităţi binecunoscute în cercetarea problemelor de sinteză proteică şi de acizi nucleici.

Includerea acestor ultime aspecte în cadrul acestui volum lărgeşte perspectiva cititorului, permiţîndu-i să cunoască şi aspectele legate de rolul pe care îl joacă în sinteza proteinelor acizii ribonucleici.

Capitolul I reprezintă o introducere în problemă, redactată de Campbell şi Sargent. El cuprinde o succintă, dar foarte completă trecere în revistă a cunoştinţelor actuale asupra sintezei proteinelor, precum şi asupra mecanismelor de reglare a acestor biosinteze.

Al doilea capitol, intitulat „Aspecte metodologice ale biosintezei proteinelor în sisteme de mamifere" sub semnătura Alexandrei von der Decken cuprinde o expunere a metodelor prin care se poate aborda sinteza proteinelor în cadrul unor diverse modele experimentale. Se apreciază foarte critic avantajele şi dezavantajele diferitelor sisteme studiate, începînd cu urmărirea sintezei proteice la nivelul organului izolat şi terminînd cu sistemele acelulare.

Următorul capitol, intitulat : „Biosinteza proteinelor specifice în sistemele de mamifere", redactat de Sargent, expune rezultatele obţinute în studiul diverselor sisteme sintetizatoare de proteine la mamifere. Sînt trecute în revistă : sinteza hemoglobinei, sinteza proteinelor în ficat şi glanda mamară, sinteza insulinei şi a ribonucleazei la nivelul pancreasului, precum şi sinteza lizozimului şi a ovalbuminei în oviduct.

Aspectul informaţional al biosintezei proteinelor este abordat în cadrul capitolului IV, intitulat : „Biochimia codului genetic", de M.S. Bretscher şi O. V. Jones, specialişti binecunoscuţi în studiile de „lectură" a mesajului genetic, care expun în acest capitol corespondenţa informaţională dintre secvenţa nucleotidelor din structura acidului ribonucleic-mesager şi secvenţa aminoacizilor din lanţurile polipeptidice. Se tratează în amănunt, de asemenea, problemele punctuaţiei mesajului genetic.

În sfîrşit, volumul se încheie printr-un capitol redactat de Kirby, consacrat acizilor ribonucleici şi rolului lor în biosinteza proteinelor.

Sub titlul „Izolarea acizilor ribonucleici pentru studiile de biosinteză a proteinelor" se discută tehnicile de izolare şi purificare a acizilor ribonucleici mesager, ribozomial şi de transfer al aminoacizilor, corelate cu diversele aspecte ale problemelor de sinteză a proteinelor.

Cuprinzînd o bibliografie foarte bogată, pe drept cuvînt „la zi", lucrarea, prin planul ei de alcătuire şi prin deosebita competenţă a autorilor ei, se recomandă drept o excelentă punere la punct a problemei atît sub aspect teoretic cît şi, mai ales, sub aspect practic experimental.

Lectura ei va fi de un ajutor nepreţuit medicilor, biologilor, chimiştilor şi tuturor celor preocupaţi de pasionanta problemă a sintezei proteinelor.

Dr. Gr. Ghyka
Institutul „Dr. I. Cantacuzino",
Bucureşti

E. KOWALSKI şi S. NIEWIAROWSKI *Biochemistry of blood platelets* (Biochimia trombocitului), Academic Press, London—New York; Polish Scientific Publishers, Warszawa, 1967, 191 p.

Această carte cuprinde o parte din referatele generale prezentate la a treia adunare a Federaţiei europene a societăţilor de biochimie, ce a avut loc la Varşovia între 4 şi 7. IV.1966. Datorită identităţii preocupării lor (studiul biochimic al trombocitelor), ele au fost susţinute într-o şedinţă specială, sub forma unui colocviu, apoi înmănunchiate în acest volum.

De la început trebuie spus că problema tratată este pe cît de importantă, pe atît de grea şi insuficient clarificată.

Investigaţia asupra plachetelor a atins în prezent nivelul molecular, ceea ce a permis adîncimea studiului acestora, la scară de echipament enzimatic. În acest mod, oarecum neglijatul trombocit a revenit azi în centrul preocupărilor coagulologilor din întreaga lume; latura biochimică a acestor cercetări deţine la ora actuală cea mai mare pondere.

În număr de 14, referatele generale poartă semnături ale unor autorităţi de marcă, pe plan internaţional, în acest domeniu.

Referatul lui Roskam face o utilă şi interesantă punere la punct (în lumina ultimelor descoperiri) a implicaţiilor trombocitului în cursul hemostazei şi coagulării sîngelui: adeziune, agregare, generare de tromboplastină, generare de trombină, conversiunea fibrinogenului în fibrină şi retracţia cheagului.

Davey şi Lüscher analizează în amănunt, graţie celor mai moderne tehnici, întreaga gamă a conţinutului proteic al trombocitelor.

Deutsch şi Lechner raportează ultimele date cu privire la factorii trombocitari ai coagulării, atît cei din atmosfera periplachetară (care după origine sînt extratrombocitari) cît mai ales pe cei din interiorul trombocitului (endotrombocitari) care-i sînt proprii, reprezentînd produse ale efortului său de sinteză proteică (Fp 2, Fp 3, Fp 4, Fibrinogen, Trombostenină, proactivator fibrinolitic şi antiplasmină).

Referatul lui Niewiarowski, Farbiszewski şi Poplawski adînceşte datele celui anterior privitoare la doi din factorii trombocitari: PF 2 şi PF 4.

Salmon prezintă un deosebit de interesant studiu cu privire la imunologia plachetară, analizînd în amănunt toţi constituenţii antigenici ai trombocitului, ca şi anticorpii cărora stimulul lor le dă naştere.

Libanska prezintă un studiu foarte minuţios asupra ultrastructurii — studiate la microscopul electrono-optic — a trombocitelor umane în timpul desfăşurării in vitro a procesului coagulării sîngelui.

Referatul lui Holmsen prezintă studiul metabolismului adeninnucleotidului, efectuat în paralel în trombocite şi în plasmă. Balanţa dintre ATP şi ADP este studiată în diferite momente

din ciclul coagulării ; în special fenomenul de largaj (release) al acestora din citoplasma trombocitelor în mediul ambiant, sub influența stimulului constituit de contactul cu colagenul.

Kowalski și colaboratorii fac în referatul imediat următor o fericită completare a problemei tratate mai sus, prezentînd o concepție lizozomică asupra fenomenului de largaj, în legătură cu mecanismul atît de interesant al metamorfozei vîscoase a plachetelor.

În referatul lui Spaet și Lejnieks este înfățișată deosebirea de comportament a plachetelor față de leucocite în ce privește modul cum răspund la ADP, în condiții de lucru identice. În timp ce leucocitele nu își iau energia din ADP, plachetele îl defosforilează, ceea ce îl indică drept o mare sursă de energie pentru ele, utilizată în realizarea fenomenului de agregare.

F. Markwardt prezintă un interesant studiu asupra largajului de amine biogenice din plachete sub influența diferiților stimuli ca : trombina, tripsina, papaina, veninurile unor șerpi, anestezice și antihistaminice.

Caen și colaboratorii prezintă un referat foarte bine documentat asupra unor procese enzimatice mai importante petrecute în plachete în timpul conservării lor. Ei leagă în mod foarte sugestiv variațiile din echipamentul enzimatic trombocitar de modificări în morfologia și funcționalitatea plachetară.

Referatul lui Mustard și colaboratorii prezintă un admirabil studiu asupra mecanismului intim al interacțiunii plachetelor cu diferite suprafețe (colagen, complex antigen-anticorp, particule de polistiren, cristale de acid uric). Se evidențiază rolul important jucat în această interacțiune de globulinele plasmatice, ca factor intermediar adsorbit pe suprafețele de contact.

Kopec și colaboratorii prezintă un interesant raport cu privire la interacțiunea dintre plachete și produșii de degradare fibrinolitică a fibrinogenului și fibrinei, ca și la influența negativă pe care această interacțiune o are asupra procesului hemostazei.

Ultimul referat este al lui Gross, Löhr și Waller care fac o amplă prezentare a defecteor genetice ale metabolismului plachetar, cauză a trombocitopatiilor ereditare. Sînt clasificate cele 4 grupe ale acestora și se arată, la fiecare, tulburarea metabolică ce o caracterizează.

Trebuie remarcat modul judicios în care s-a efectuat ordinea de succesiune a acestor referate. Ea este foarte bine realizată, într-o înlănțuire logică, de la istoricul problemei și pînă la aspectele genetice ale trombopatiilor. Cu fiecare nou referat, pe care-l parcurge și care e la zi cu ultimele noutăți privitoare la capitolul tratat, cititorul cîștigă o nouă treaptă în adîncirea explorării trombocitului. Acest deosebit merit, care face volumul pe cît de interesant pe atît de agreabil de citit, revine celor doi redactori, Kowalski și Niewiarowski, care au izbutit în acest mod să pună într-o deosebită valoare conținutul volumului publicat.

Merită să fie relevate și condițiile grafice excelente în care se prezintă această carte.

Cecil Poppa
Șef Laboratorul de coagulare,
Centrul de hematologie, București

New Trends in the Treatment of Cancer (Noi orientări în tratamentul cancerului) sub red. L. Manuila, S. Moles și P. Rentchnick, Springer, Berlin—Heidelberg—New York, 1967, 200 p., 37 fig.

Volumul al 8-lea din seria „Recent Results in Cancer Research", realizat de 14 din cei 50 de colaboratori ai colecției, figuri reprezentative ale oncologiei clinice, se adresează atît clinicienilor, care pot astfel să capete cu ușurință priviri de ansamblu asupra unor aspecte actuale, teoretice și practice, despre profilaxia și tratamentul bolii canceroase, cît și—mai ales—oncologilor care cercetează domeniile extraclinice.

Colecția citată își îndeplinește cu autoritate rolul de orientare și selecție în stufoasa literatură despre cancer.

În primul capitol, prof. H.E. Bock și U. Dold de la Universitatea din Tübingen se ocupă de *diagnosticul precoce și importanța lui pentru pronostic și terapie.* Sînt prezentate multiplele metode de diagnostic clinic și de laborator și oportunitatea lor în relație cu grupele de vîrstă, sexul și chiar ocupațiile populației din diferite regiuni ale globului. Simptomatologia necaracteristică a stadiilor incipiente și pronosticul lor favorabil impun organizarea unei metode eficiente de depistare, autorii probabil necunoscînd metoda românească a „consultației oncologice obligatorii", care în condițiile noastre îmbracă un caracter de masă.

Abordînd problema *tratamentului leziunilor precanceroase*, prof. M.Dargent (Lyon), clinician prin excelență, demonstrează superioritatea intervențiilor radicale, cu prețul unor mutilări minime. Profilaxia cancerului înseamnă prevenirea apariției leziunilor precanceroase, tratamentul lor chirurgical (în momentul optim al echilibrului dintre celulele maligne și gazdă) și instituirea de măsuri postoperatorii.

Prof. L.F. Larionov (Moscova) expune principiile *chimioterapiei cancerului*, importanța efectelor toxice secundare în aprecierea efectului citostatic terapeutic, căile de administrare a drogurilor și posibilitățile de asociere cu alte metode de tratament, mai ales cu radioterapia, în funcție de sensibilitatea fazelor ritmului mitotic.

Progresele în radioterapie, după M. Tubiana și D. Chassagne de la Institutul G. Roussy, sînt de ordin tehnic și pronostic. Folosirea energiilor înalte se repercutează favorabil asupra absorbției dozei la piele, os și volumul țintă, acesta putînd fi modelat datorită diverselor dispozitive utilizate. În curieterapie, iradierea profesională a fost înlăturată datorită „procedeului încărcării radioactive ulterioare". Succesul tratamentului radiant, exclusiv sau asociat, depinde de utilizarea tuturor achizițiilor recente în urma unei colaborări cu ceilalți specialiști.

G. Pack din New York, cunoscut prin largile intervenții care merg pînă la hemicorporectomie, susține principiile tehnice și pronostice ale *chirurgiei oncologice* pentru fiecare organ al tractului gastrointestinal (chiar cu prețul unor consecințe iatrogene reductibile), ca și pentru torace, sarcoamele părților moi și articulațiilor, ale exenterației pelviene și ale homotransplantelor de organe.

Tratamentul cancerului de sîn diseminat, prin intervenții pe glandele endocrine, administrare de hormoni sau chimioterapice, și selecția pacientelor în funcție de instalarea menopauzei, de hormonosensibilitatea tumorilor, de ritmul lor evolutiv, este dezbătut de prof. A.Tagnon. (Belgia) și colaboratorii, iar *tratamentul hormonal al cancerului de prostată* este prezentat de C. Hodges și de D.Kirschheim de la Universitatea din Oregon — S.U.A. Prezentarea realizărilor obținute în tratamentul hemopatiilor maligne revine prof. J. Bernard, care ia ca exemplu practic boala Hodgkin, reconsiderînd eficacitatea asocierii radio-chimioterapice, și leucemia acută, în care un complex de droguri se administrează după scheme proprii. Realizările în reglarea citopoiezei, în stimularea capacității de apărare a organismului, deschid interesante perspective în imunoterapia cancerului.

Perfuziile regionale pentru melanoamele și sarcoamele membrelor sînt recomandate cu autoritate de Q. Creech Jr. și E. Krementz (New Orleans), în cadrul unui tratament chimiochirurgical.

Directorul Institutului de cancer din Paris, P. Denoix, analizînd *greșelile* cele mai frecvente care se fac în *tratamentul cancerului*, consideră că ele provin din necunoașterea interacțiunii tumoră-gazdă. Cunoașterea ritmului evolutiv al tumorii, a ponderii elementelor din stadialitatea clinică, confruntate cu examenul extemporaneu, duce la exagerarea sau limitarea diverselor arme terapeutice în cadrul unui tratament complex.

Prof. U. Veronesi (Milano) discută una din problemele cheie : *factorii biologici* care influențează pronosticul și tratamentul cancerului. În afară de rolul vîrstei și sexului, celulele maligne circulante pot de multe ori influența negativ pronosticul, deoarece „rezistența gazdei"

este modificată hormonal sau imunologic şi poate duce astfel la o regresiune spontană sau, dimpotrivă, la o metastazare rapidă.

Expunînd experienţa Institutului de cancer „G. Roussy" în ceea ce priveşte *organizarea luptei anticanceroase*, P. Denoix subliniază necesitatea creării unor centre bine dotate tehnic cu diverşi specialişti care să colaboreze în echipă, avînd responsabilitatea stabilirii diagnosticului, indicaţiilor terapeutice, aplicării tratamentului şi urmăririi bolnavilor, idei care de aproape 20 de ani stau la baza activităţii Institutului oncologic Bucureşti.

Dr. M. Spiridon,
Institutul oncologic
Bucureşti

Instrumentation in biochemistry (Instrumentaţia în biochimie), Biochemical Society Symposia, number 26, sub red. T. W. Goodwin, Academic Press, London, New York, 1966.

Materialul expus în cele 113 pagini ale acestei lucrări prezintă, sub iscălitura unor personalităţi competente, unele aspecte metodologice, o parte din aparatura şi tehnicile care au contribuit la impetuosul progres al biochimiei moderne.

Şase direcţii de dezvoltare fundamentale pentru rafinarea investigaţiei biochimice fac obiectul a tot atîtea expuneri care conţin atît date tehnice cît şi teoretice şi aplicative din domeniile respective.

T. J. Bowen se ocupă de problema *centrifugelor de laborator*, sub multiplele ei aspecte, atrăgînd atenţia asupra trăsăturilor esenţiale ale echipamentului modern de separare. Se trec în revistă factorii care afectează viteza de sedimentare, se dau detalii de construcţie pentru realizarea unor valori înalte ale cîmpului centrifugal, apoi date privitoare la materialul (aluminiu, titan) şi la geometria rotorului ultracentrifugelor (pentru 60 000 .... 70 000 de ture), la tipurile comerciale, centrifugele preparative pentru înaltă rezoluţie a amestecurilor, ultracentrifugarea zonală, ultracentrifugele analitice (Beckmann, MSE, Christ, Metrimpex), unele tipuri speciale (ca centrifuga ADL—Cohn) pentru centrifugarea sîngelui, centrifuga pentru cromatografie, în care cîmpul de forţă centrifugală accelerează progresul unei cromatografii circulare (utilă în special pentru separarea izotopilor cu viaţă scurtă).

T. Caspersson şi G. Lomakka, accentuînd asupra necesităţii diferitelor tipuri de metode de mare sensibilitate şi putere de rezoluţie în studiul biologiei celulare, descriu variante de *microspectroscopie* dezvoltate în cadrul metodelor biofizice care i-au preocupat în special în legătură cu lucrările efectuate în institutul Karolinska din Stockholm. Autorii atrag atenţia asupra avantajului de bază al microspectroscopiei, anume creşterea sensibilităţii metodei ca urmare a descreşterii dimensiunilor obiectelor măsurate, şi trec în revistă diferite procedee pentru măsurători directe *in situ*, în celule sau pe secţiuni tisulare. Sînt descrise : ultramicrospectrofotometrul universal, care permite măsurători de absorbţie în domeniul spectral de la 230 A pînă la roşu, cu aplicare în studiul acizilor nucleici şi al sintezei proteinelor (hemoglobină, în cercetările autorilor), ultramicrospectrograful fotoelectric, ultramicrospectrofotometrul cu preselecţia cîmpului de măsurare, la care se adaugă ultramicrointerferometrul şi microfotometrele de fluorescenţă cu rezoluţie înaltă (studiul ARN şi ADN).

A. Ehremberg prezintă aplicaţiile recente *ale rezonanţei de spin electronic în biochimie*, arătînd utilitatea ei pentru studiul compuşilor cu electroni impari (radicali liberi, stări tripletice,

compuşi ai ionilor metalici cu orbitele incomplet saturate cu d-electroni). Rezultă că s-au obţinut concluzii interesante în studiul sistemelor implicate în procesele de oxidoreducere, cu informaţii asupra structurii acestor specii paramagnetice, cît şi asupra transformării lor în reacţiile enzimatice sau în interacţiunea cu liganzii. Cele mai detaliate informaţii asupra structurii şi nivelelor energetice se obţin pe cristale unice de specii paramagnetice (hemoglobină, mioglobină); sînt citate rezultatele obţinute în studiul peroxidazelor ferocitocromului C, radicalilor flavinici, xantinoxidazei, iar din domeniul sistemelor redox inactive sînt subliniate studiile asupra legăturilor ionilor paramagnetici cu acizii nucleici.

În principiu, este subliniată posibilitatea ca spectrul de rezonanţă de spin electronic înregistrat să permită evaluarea concentraţiei speciei absorbante.

În toate ramurile chimiei moderne sînt din ce în ce mai necesare *studii de cinetică*, care devin posibile prin aplicarea unor tehnici simple la determinarea parametrilor cinetici ai reacţiilor elementare. B. Havsteen prezintă în acest sens aplicarea metodelor „în flux" şi relaxare (produsă prin aplicarea unei perturbaţii într-un sistem în echilibru stabil) la studiul reacţiilor rapide. În sistemele biologice, aceste reacţii cu semnificaţie fiziologică sînt extrem de abundente (cataliza enzimatică). Biochimiştii beneficiază de aceste noi tehnici pentru a măsura vitezele foarte mari ale reacţiilor biochimice care stau la baza metabolismului. Autorul subliniază avantajele şi limitele metodelor respective. Pentru eliminarea limitelor sînt preconizate tehnicile mixte, care combină fluxul cu tehnica de perturbaţie, perturbaţia fiind realizată fie prin impuls unic, fie ca funcţie de forţă sinusoidală.

În sprijinul celor expuse sînt prezentate diagrame, fotografii şi secţiuni prin aparatele cu ajutorul cărora se aplică respectivele metode. Capitolul se încheie prin prezentarea bazelor teoretice ale metodei de relaxare şi aplicaţiile ei în special la cataliza enzimatică; aplicări potenţiale privesc efectele alosterice, denaturarea proteinelor, replicarea acizilor nucleici, fotosinteza, fosforilarea oxidativă.

Dezvoltarea analizelor automatizate este expusă de A.A. Evans şi A.J. Thomas cu aplicare în cercetările de nutriţie.

Conturînd necesitatea automatizării analizelor biochimice, autorii afirmă superioritatea controlului unui proces analitic în sistem de flux continuu, fapt care a condus pe Spackmann, Moore şi Stein la introducerea autoanalizorului cu canale multiple, descris principial în capitolul respectiv. O serie de scheme redau aranjamentul tipic al unui autoanalizor, caracteristicile de transfer ale unui sistem analitic şi efectele asupra acurateţei lucrului la diferite viteze de circulaţie ale probelor, diagrama fluxului pentru determinări simultane a 12 constituenţi sanguini, precum şi cateterul cu dublă canulă pentru prelevarea probelor de sînge.

În capitolul final, semnat de David Garfinkel, este expusă interesanta problemă a *modelării în biochimie*, sub titlul „Calculatorul digital ca instrument biochimic: *simularea sistemelor multienzimatice*".

Sistemele enzimatice pot fi modelate atît cu ajutorul calculatoarelor digitale, cît şi cu al celor analogice. Comercial sînt disponibile şi calculatoare hibride. Calculatoarele digitale pot fi folosite pentru studii şi previziune, pentru definirea şi rezolvarea sistemelor compuse, calculatorul convertind ecuaţiile chimice în instrucţii pentru rezolvarea ecuaţiilor diferenţiale corespunzătoare.

Modelarea sistemelor biochimice poate fi făcută cu dominanţa reprezentării explicite a enzimelor (cele mai mult studiate fiind cele glicolitice) sau în sisteme în care prevalează reprezentarea neexplicită (exemplu: depleţia posibilă a intermediarilor ciclului acidului citric la concentraţii ridicate de amoniu, pentru a explica coma hepatică).

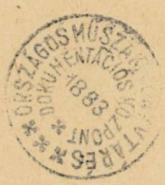
Textul este însoţit de scheme şi diagrame demonstrative.

Se prevede utilizarea posibilă a metodei atît în studii de cinetică enzimatică, cît şi în cercetări privitoare la trecerea materialelor prin membrane, sinteza şi degradarea proteinelor, reglarea genetică şi sinteza substanţei vii.

Expunerile sînt bazate pe experienţa personală a autorilor cît şi pe date din literatură, la sfîrşitul fiecărui capitol fiind anexată o listă de titluri bibliografice, de la 20 pînă la 50.

Lucrarea se adresează chimiştilor, biochimiştilor, biofizicienilor, biomatematicienilor, biologilor şi fiziologilor, fiind de mare actualitate şi cu interesante perspective de viitor metodologic.

Dr. Marcela Zamfirescu-Gheorghiu
Institutul de medicină internă al
Academiei Republicii Socialiste România,
Bucureşti



În ziua de 20.VI. 1967, a avut loc ședința subcomisiei de Biochimie a Academiei R.S.R. Filiala Iași, cu următoarea ordine de zi :

1. Ababei L., Filip M., Raler C., Moisiu C.
   Modificări metabolice în eritrocite și reticulocite sub influența radiațiilor ionizante
2. Sibi M., Andreescu M., Cernătescu D., Gheorghiță N., Raler C., Șerban F.
   Contribuțiuni la studiul metabolismului fosforat în diabet
3. Tudoranu M., Berlinschi E., Corneleac A.
   Considerațiuni asupra modificărilor metabolismului fosforat în nefropatiile infantile
4. Trandafirescu M., Raler C.
   Modificări în activitatea glutamat-dehidrogenazei în tumori
5. Șerban F.
   Activitatea cistaminei în metabolismul intermediar al reticulocitelor

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : Viaţa ştiinţifică, în care, prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. Recenzii, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 2, Raionul 30 Decembrie.

1967 MAR 15

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA
ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii ribonucleici celulari şi virali**, 1966, 25×17,50, 375 p., 8 pl., legat, anvelopă, 26 lei.

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţa şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie**, 1966, 25×17,50, 285 p., 18 pl., legat, anvelopă, 27 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese. Œuvres choisies**, 1965, 25×17,50, 687 p., legat, anvelopă, 44 lei.

* * * **Omagiu acad. prof. RALUCA RIPAN**, 1966, 30,50×21,50, 628 p. + 2 pl., legat, anvelopă, 50 lei.

ST. CERC. BIOCHIM. TOMUL 11, NR. 1, P. 1—100, BUCUREŞTI, FEBRUARIE 1968

I. P. „Informaţia" — c. 6233

43816

Lei 12.—

F1330

studii și cercetări de biochimie

2

TOMUL 11
1968

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
St. cerc. biochim., tomul 11, nr. 2, p. 101—208, București, mai 1968

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU.

Secretar de redacție:

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 48 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se fac prin CARTIMEX, Căsuța poștală 134—135, București, Republica Socialistă România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie".

ADRESA REDACȚIEI:

București, *Str. Docenților nr. 20*
Sectorul 1.

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tom. 11, nr. 2 1968

MUSZAKI KÖNYVTÁR 1969

SUMAR

Pag.

R. CIAGOVEŢ, Problema apariţiei vitaminelor coenzime şi a caracterului lor exogen 105

L. BOTOŞENEANU, Influenţa glucozei şi a zaharozei exogene asupra valorilor azotului proteic şi azotului total din *Solanum lycopersicum* 111

I. BRAD, N. HURDUC, ST. NICULESCU, Z. MARCU, Izoenzimele catalazice şi peroxidazice în endospermul, scutelul, tulpiniţa şi radicula plantelor de porumb 117

L. BUZILĂ, Anticorpi anti-DANS şi interacţiunea lor cu haptena fluorescentă 121

H. GHIRILEI, S. OERIU, M. DOROBANŢU, G. CURTICOPEANU, I. OERIU, Modificări biochimice şi fiziologice la porumbul HD 208, sub acţiunea Folcisteinei Oeriu „P" 127

AL. CIPLEA, GH. BUBUIANU, N. DRĂGULESCU, Cercetarea catecolaminelor în lichidul cefalorahidian 133

C. DRAGOMIRESCU, Hidroliza triptică a IgG de iepure fluorescentă denaturată prin căldură. 141

A. GHEORGHIU, E. IONESCU-MATIU, Determinarea conţinutului unor alcaloizi în rădăcinile de *Vinca rosea* L., sănătoasă sau infectată cu virus . . . 153

I. GONŢEA, E. BISTRICEANU, M. MANEA, M. DRĂGHICESCU, Importanţa aportului proteic în intoxicaţia cronică cu toluen 159

E. KÓTAY-LAKATOS, Determinarea comparativă a vitezei de reacţie a plasminei asupra fibrinei provenite de la reumatici şi martori sănătoşi 167

C. MEDEŞAN, Participarea glicolizei la biosinteza fosfocreatinei din muşchii gastrocnemieni de broască perfuzaţi 173

I. A. MOLNAR, J. WINTER, Acţiunea apei oxigenate şi a altor substanţe asupra inhibării cu cisteină a fosfatazei alcaline 181

NOTE DE LABORATOR

V. ALEXANDRESCU, F. MIHĂILESCU, Realizarea unei enzimoproteinograme pentru catalază 187

NECROLOG 191

RECENZII 195

VIAŢĂ ŞTIINŢIFICĂ 207

St. cerc. biochim., tomul 11, nr. 2, p. 101—208, Bucureşti, mai 1968

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tomul 11 (1968) Nr. 2

ORSZÁGOS MŰSZAKI KÖNYVTÁR ÉS DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT

CONTENT

Page

R. CIAGOVEŢ, The problem of the origin of coenzyme vitamins as well as of their exogenous character 105

L. BOTOŞENEANU, The influence of the exogenous glucose and sucrose on the proteic and total nitrogen values from *Solanum lycopersicum* 111

I. BRAD, N. HURDUC, ST. NICULESCU, Z. MARCU, The peroxidasic and catalasic isoenzymes in maize endosperm, scutelum, plumule and radicle 117

I. BUZILĂ, Anti-DANS antibodies and their interaction with the fluorescent hapten 121

H. CHIRILEI, S. OERIU, M. DOROBANŢU, G. CURTICOPEANU, I. OERIU, Biochemical and physiological modifications of HD 208 maize by Oeriu "P" Folcysteine action 127

AL. CIPLEA, GH. BUBUIANU, N. DRĂGULESCU, Cathecholamine investigation in the cerebrospinal fluid 133

C. DRAGOMIRESCU, The tryptic hydrolysis of DANS-labeled rabbit IgG denaturated by heat 141

A. GHEORGHIU, E. IONESCU-MATIU, Determination of the content of some alkaloids in healthy or virus infected roots of *Vinca rosea* L. 153

I. GONŢEA, E. BISTRICEANU, M. MANEA, M. DRĂGHICESCU, The importance of the proteic contribution in chronic intoxication with toluene 159

E. KÓTAY-LAKATOS, The determination of the reaction rate of plasmine on the fibrin resulted from rheumatics and healthy controls 167

C. MEDEŞAN, Participation of glycolysis to phosphocreatine biosynthesis in perfused frog gastrocnemius muscles 173

I. A. MOLNAR, J. WINTER, The action of hydrogen peroxide and other substances on the inhibition of alkaline phosphatase by cysteine 181

LABORATORY NOTE

V. ALEXANDRESCU, F. MIHĂILESCU, An enzymoproteinogram for catalase 187

OBITUARY 191

BOOK REVIEWS 195

MEETINGS 207

St. cerc. biochim., tomul 11, nr. 2, p. 101–208, Bucureşti, mai 1968

ST. CERC. BIOCHIM. 11, 2, 105–109 (1968)

PROBLEMA APARIȚIEI VITAMINELOR COENZIME ȘI A CARACTERULUI LOR EXOGEN *)

ROSTISLAV CIAGOVEȚ

Rezumat. — Se discută evoluția biochimică a vitaminelor coenzime și caracterul lor exogen, de la sinteza lor abiotică în etapa prebiologică a dezvoltării materiei vii pînă la formarea complexelor enzimatice care realizează biosinteza lor în procesul de evoluție a lumii organice.

Prin tradiție, vitaminele sînt considerate ca făcînd parte dintre compușii organici micromoleculari (în afară de aminoacizi și glucide), pe care majoritatea organismelor, în special cele umane și animale, trebuie neapărat să le primească din exterior. Insuficiența acestui aport este cauza perturbărilor care se produc în metabolismul substanțelor, în procesele fiziologice și în funcțiile biologice ale organismului. Vitaminele sau produsele transformării lor biologice sînt participanți biochimic activi, indispensabili metabolismului celular.

Vitaminele aparțin unor clase diferite de compuși organici și, din această cauză, au o participare multiformă în verigile intermediare ale metabolismului și în funcțiile fiziologice ale organismelor animale și vegetale. Dintre ele se poate distinge grupa de compuși necesari formării coenzimelor : vitaminele coenzime — heterociclice (tiamina, biotina, grupa acizilor folici, cobalaminele, acidul nicotinic sau amida lui, piridoxina) și alifatice (acizii lipoic și pantotenic). O grupă aparte este constituită din derivații izoprenici (vitaminele din grupa E, K, A și D) și din compușii polimetilici (colina, acidul pangamic, carnitina). O poziție aparte ca structură și funcție o ocupă derivații glucidelor — acidul ascorbic și inozitolul.

Acumularea materialului privind sinteza abiotică și biologică și studierea proprietăților chimice ale vitaminelor, ca și datele biochimiei comparate, permit înțelegerea mai profundă a apariției vitaminelor și a caracterului lor exogen.

I

Majoritatea vitaminelor au o răspîndire tot atît de generală în lumea organică ca și alte structuri micromoleculare necesare metabolismului substanțelor — pirimidinele, purinele, porfirinele ș.a. Vitaminele sau

*) Traducerea a fost efectuată de Corina Iordache, cercetător principal la Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România.

derivații lor participă identic la reacțiile biochimice din celulele vegetale și animale. De aici reiese că numărul de vitamine care predomină trebuie să fie raportat la compușii care sînt incluși în compoziția materiei vii din cele mai vechi etape ale formării acesteia. Apariția funcțiilor fiziologice și metabolice ale vitaminelor din grupa A, necesare activității organelor fotoreceptoare ale nevertebratelor superioare și tuturor vertebratelor, trebuie raportată, pe cît se pare, la etape mult mai tîrzii ale evoluției lumii animale. Evident, rolul biochimic al vitaminelor din grupa D, care sînt necesare numai vertebratelor, a apărut și mai tîrziu, în legătură cu formarea scheletului intern, care posedă componente minerale de tipul apatitei (scheletele de calciu ale nevertebratelor se compun de preferință din carbonat de calciu).

Cobalaminele, de care plantele superioare și o parte din plantele inferioare nu au nevoie, trebuie să fie raportate la substanțele biochimic active vechi, deoarece ele sînt sintetizate de către organisme considerate apropiate de cele mai vechi clase de ființe vii (algele verzi, albastre și altele).

Teoria apariției vieții pe pămînt, elaborată de A.I. Oparin [1] și J. Haldane [2], a fost impulsul cercetărilor experimentale privind posibilitatea sintezei abiotice a celor mai importanți compuși organici biologici din substanțe relativ simple (CO_2, CH_4, H_2, H_2O, HCOH, HCN, NH_3, $NH_2—NH_2$, NH_2OH ș.a.), în condiții fizice asemănătoare celor din etapa prebiologică a dezvoltării planetei noastre. Aceste cercetări au arătat realitatea formării abiotice a unei serii întregi de substanțe organice — monoze, aminoacizi, pirimidine, purine, porfirine, fosforilarea nucleozidelor și a altor compuși —, care pînă în ultimul timp au fost prezentate ca produși specific biogeni, drept rezultat al evoluției biochimice. Materialele comunicărilor de la simpozionul asupra apariției vieții pe pămînt [3] și de la simpozionul consacrat apariției sistemului prebiologic [4] atestă convingător faptele. Dacă lucrările lui Wöhler au suprimat bariera dintre chimia organismelor sau chimia organică și chimia minerală (anorganică), iar descoperirea lui Berthelot despre posibilitatea obținerii benzolului din acetilenă a stabilit legătura dintre clasele alifatice și cele aromatice ale chimiei organice, atunci lucrările menționate din ultimul timp au aruncat puntea între sinteza abiotică și formarea biochimică a unor substanțe organice care pînă nu de mult păreau componente biogene specifice, produse ale evoluției materiei vii.

Trebuie să presupunem că vitaminele, în orice caz vitaminele coenzime, au avut inițial o proveniență abiotică. Aceasta o confirmă descoperirea, printre multiplele produse ale sintezei abiotice, a pteridinelor „favorizante" [5] și a piridinelor vitaminizante [6]. Evident, evoluția biochimică a vitaminelor coenzime nu s-a rezumat numai la crearea lor, ci, dimpotrivă, a avut loc o „perfecționare" recunoscută, iar mai tîrziu, pe măsura reducerii sintezei lor abiotice și a aportului lor exogen, o formare a „complexelor" enzimatice care realizează biosinteza lor.

Studierea proprietăților chimice ale unor vitamine coenzime permite presupunerea că ele, alături de ionii metalelor, au fost primii biocatalizatori ai anumitor reacții. Se știe că piridoxina realizează reacția de transaminare fără participarea apoenzimei [7]. Nucleotidizarea ulterioară și proteinizarea (unirea cu apoenzima) au intensificat activitatea lor cata-

litică și au transmis acestor complecși o specificitate de substrat. Aici se impune cunoscuta analogie cu ionii de fier, a căror activitate catalitică crește — de 1 000 de ori prin includerea lor în porfirină și încă de 10 milioane de ori prin unirea hemului cu proteina specifică [8]. Se înțelege că prin aceasta nu este exclusă importanța formării din aminoacizi a enzimelor-proteine.

Absența structurilor asemănătoare vitaminelor coenzime dintre compușii micromoleculari, importanți din punct de vedere biologic, trebuie considerată de asemenea drept un indice al apropierii lor de prototipurile abiotice. Spre deosebire de ele, vitaminele liposolubile sînt similare ca structură și legate genetic de structurile care nu se raportează la vitamine și reprezintă derivați izoprenici (vitaminele grupului E și K sînt apropiate de chinonele plantelor și animalelor, vitaminele grupului A de carotinoizii vegetali, vitaminele grupului D de steroizi). De aceea, problema apariției lor trebuie considerată ca un caz particular al evoluției structurilor izoprenice, care urmează să fie examinat separat.

III

Biosinteza vitaminelor coenzime din produșii nespecifici ai metabolismului intermediar, ca și a altor compuși care s-au dovedit a fi componente structurale ale formațiunilor celulare, a apărut, după cum s-a arătat, în condițiile reducerii sintezei lor abiotice. Necesitatea secundară în vitamine exogene — una dintre manifestările unui fenomen mai general — este o formă particulară a heterotrofiei. Prin aceasta se înțelege necesitatea manifestată de individul unei specii (sau al unei unități taxonomice mult mai mari) de a obține sistematic, din afară, compuși organici bine determinați — aminoacizi indispensabili și acizi grași, vitamine, steroizi și altele. Evident că apariția formelor particulare ale heterotrofiei și importanța lor biologică pot avea trăsături generale independent de structurile chimice ale factorilor alimentari exogeni.

Regularitatea cu care decurg apariția și răspîndirea felurilor particulare ale heterotroficității este demonstrată precis de necesitatea de acid ascorbic exogen a vertebratelor (tabelele 1 și 2) și cea de carnitină (vitamina B_T) a insectelor. Punîndu-se în evidență în limitele unei populații de specii izolate, de obicei îndepărtate unele de altele din punct de vedere sistematic, apariția determinată a heterotroficității particulare, biologic utilă, se consolidează prin selecție și devine un indice biochimic specific. O asemenea apariție a heterotroficității particulare, inerentă speciei determinate, se observă ulterior la toate speciile, pentru care a fost un precursor evolutiv. Se pare că necesitatea obținerii de către animale a vitaminelor coenzime exogene atestă apariția ei în perioada formării tipului animal de metabolism la strămoșii comuni. Necesitatea de acid ascorbic exogen a tuturor primatelor a dat naștere precursorilor evolutivi generali, ca rezultat al „decăderii" informației genetice, care condiționează formarea „complexului" enzimatic ce transformă acidul glucuronic în vitamină C.

Conform ideii că „natura folosește orice posibilitate de economisire a genelor necesare sintezei" [14], presupunem că obținerea vitaminelor

exogene de către animale este o „economie" importantă pentru fiecare organism, faţă de obligativitatea obţinerii din afară a aminoacizilor indispensabili (pentru sinteza a 10 aminoacizi indispensabili sînt necesare 60 de enzime, iar pentru cele mai studiate vitamine mai mult de 100). În acest fel, în condiţiile compensării exogene, absenţa biosintezei vitaminelor trebuie privită nu ca o pierdere sau *lipsă*, ci ca o *eliberare* a organismului de necesitatea de a face cheltuieli inutile.

Tabela 1

Repartiţia necesarului de vitamină C exogenă la animale

Vertebrate (*Vertebrata*)		
Păsări (*Aves*)	*Pycnonotidae*	*Pycnonotus cafer* L. [9]
Mamifere (*Mammalia*)	Rozătoare (*Rodentia*)	Cobai (*Cavia porcellus* L.)
	Lilieci (*Chiroptera*)	(*Pteronus medius* L.) [10]
	Primate (*Primates*)	
Artropode (*Arthropoda*)	Insecte (*Insecta*)	*Schisocerca gregaria* Foss [11]

Tabela 2

Repartiţia necesarului de vitamină B_T (carnitină) exogenă la insecte

Coleoptere [12] (*Coleoptera*)	*Tenebrionide*	*Tenebrio molitor* L.
		Tenebrio obscurus F.
		Tribolium confusum Duv.
		Tribolium gastaneum sire ferrugineum F.
		Gnathocerus cormitus F.
		Palorus ratzeburgi Wiss.
Diptere [13] (*Diptera*)		*Aëdes aegypti* L.

În procesul de evoluţie al lumii organice s-au creat modalităţi biochimice, fiziologice şi biologice mult mai economice de cheltuire a forţelor şi resurselor organismului pentru compensarea eliberării lui de necesitatea sintetizării vitaminelor. Astfel, datorită sistemului nervos central, prin participarea chemoreceptorilor externi şi interni, cu ajutorul „simţurilor obscure" — poftă, gust şi miros — , se uşurează căutarea şi alegerea alimentaţiei celei mai preţioase din punct de vedere biologic. Calea vitaminelor de la producător la consumator este adesea treptată. Mijloacele biologice de aprovizionare a organismului cu vitamine (ca şi cu alte componente alimentare indispensabile) conduc la formarea unor relaţii simbiotice şi parazite binare sau polinare. Una din manifestările lor este formarea tuturor aminoacizilor indispensabili şi a vitaminelor din grupa B şi vitaminei K de către microflora din stomacul taurinelor din ingerarea amestecului hrănitor, compus din polizaharide, zaharoză, macro- şi microelemente minerale, din vitaminele A, D, E şi compuşi azotaţi simpli (uree, sulfat de amoniu). Datorită acestui fapt, nu s-a observat o scădere a productivităţii sau a reproducţiei [15], „organizarea alimentaţiei" în tractul digestiv fiind mai bine exprimată la rumegătoare. Dar şi pentru alte mamifere, inclusiv pentru om, microflora intestinală joacă un rol esenţial în asigurarea cu vitamine (acizii pantotenic şi folic, vitamina K).

Acest fapt trebuie lu în considerație în cazurile unei folosiri îndelungate a antibioticelor și a u r preparate sulfamidice, care schimbă radical din punct de vedere cal iv și cantitativ compoziția microflorei intestinale.

Prezentată la red e la 25 ianuarie 1968

Institutul de biochimie al Academiei de științe a Republicii Sovietice Socialiste Ucrainene, Kiev

BIBLIOGRAFIE

1. A. I. Oparin, *Apari pe pământ*, Edit. Z. M., 1957.
2. J. Haldane, *Scienc an life*, New York—Londra, 1933.
3. * * * *Apariția vieți t*, Edit. AN S.S.S.R., Moscova, 1959.
4. * * * *The origins o ical systems and of their molecular matrices*, Academic Press, New Yor , 1965.
5. J. Oro, în *The ori ebiological systems and of their molecular matrices*, Academic Press, New York—Londra, 1965, p. 176.
6. S. W. Fox, în *The origins of prebiological systems and of their molecular matrices*, Academic Press, New York—Londra, 1965, p. 210.
7. E. Snell, în *The origins of prebiological systems and of their molecular matrices*, Academic Press, New York—Londra, 1965, p. 208.
8. M. Calvin, în *Apariția vieții pe pământ*, Edit. AN S.S.S.R., Moscova, 1959, p. 214.
9. R. N. Roy, B. C. Guha, Nature, **182**, 1 689 (1958).
10. N. C. Kar, J. B. Chatterjee, N. C. Chosh, B. C. Guha, Biochem. J., **84**, 16 (1962).
11. R. H. Dadd, Nature, **179**, 427 (1957).
12. C. Fraenke, L. S. Friedman, Vitamins Hormones, N. Y., **15**, 73 (1957).
13. K. R. P. Singh, A. W. A. Brown, Insect physiol., **1**, 199 (1957).
14. B. Davis, Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol., **XXVI** (1961).
15. N. Wirtanen, Science, **153**, 1 603 (1966).

THE PROBLEM OF THE ORIGIN OF COENZYME VITAMINS AS WELL AS OF THEIR EXOGENOUS CHARACTER

SUMMARY

The biochemical evolution of coenzyme vitamins is discussed. Data on their exogenous character, from their abiogenetic synthesis in the prebiological stage of living matter development, to the formation of enzyme complexes which achieve their biosynthesis in the process of organic compounds evolution are reported.

ST. CERC. BIOCHIM. 11, 2, 111–115 (1968)

INFLUENȚA GLUCOZEI ȘI A ZAHAROZEI EXOGENE ASUPRA VALORILOR AZOTULUI PROTEIC ȘI AZOTULUI TOTAL DIN *SOLANUM LYCOPERSICUM*

LILICA BOTOȘENEANU

Rezumat. — S-au introdus timp de 18 — 19 zile soluții de glucoză 10% sau de zaharoză 10%, cu ajutorul metodei capilare, în plante de tomate crescute în ghivece. Dozînd azotul proteic și azotul total la plantele în care s-au introdus zaharuri am constatat, numai în cazul experiențelor efectuate în condiții optime de creștere (lumină, temperatură etc.), valori scăzute față de cele obținute la plantele martor, în care s-a introdus apă. Scăderea azotului proteic și a azotului total este mai pronunțată în experiențele cu zaharoză și apare evidentă la frunze, mai slabă la tulpini și numai în unele cazuri la rădăcini.

Zaharurile introduse în plante exercită asupra acestora acțiuni diferite. Menționăm, de exemplu, stimularea creșterii la : perii radiculari de *Agrostis alba* [1], explante de *Topinambur* [2], segmente de tulpini de *Avena sativa* [3], fragmente de rădăcini de *Solanum lycopersicum* [4] etc. De asemenea, zaharurile măresc rezistența la ger [5], [6], [7], măresc rezistența la temperaturile ridicate [8] etc.

Totodată, zaharurile exogene pot modifica metabolismul substanțelor cu azot, ceea ce s-a stabilit mai ales prin lucrări efectuate pe frunze detașate de plante menținute o perioadă de timp în soluțiile diferitelor zaharuri [9] sau pe frunze în care au fost injectate zaharuri [10]. Așa, de exemplu, Mc Kee [9] menționează experiențele lui Zaleski, care, menținînd frunze de *Helianthus* în soluții nutritive, constată o sinteză a proteinelor cînd adaugă fructoză. De asemenea, Mathur [10], injectînd glucoză în frunze de *Anona squamosa*, găsește după cîteva zile o creștere a azotului proteic, mai ales în cazul cînd experiențele sînt efectuate la lumină, și menționează lucrările lui Mothes, care obține rezultate similare. Pe de altă parte, Vickery și Pucher [11], [12] constată scăderea azotului total și a azotului proteic din frunzele de *Rheum* ținute 1—2 săptămîni în apă, la lumină sau întuneric, ca și în soluții de glucoză. Rezultatele sînt deci contradictorii, și aceasta s-ar putea datora faptului, arătat de Vickery și Pucher, că detașarea frunzelor de plantă produce modificări complexe ale metabolismului.

De aceea ne-am propus să introducem unele zaharuri în plante întregi de tomate, aflate în condiții normale de existență, și să urmărim influența lor asupra azotului proteic și azotului total al plantelor.

MATERIAL ȘI METODE

Am recurs la metoda capilară [13], care permite introducerea în plante, printr-un fitil fixat în tulpină, a diferitelor soluții aflate în tuburi de sticlă îndoite în formă de U. Cantitatea de soluție pătrunsă în plante se poate măsura, iar plantele pot trăi timp îndelungat în aceste condiții.

Experiențele au fost efectuate pe plante de tomate, în vîrstă aproximativ de 2 luni, din soiul Sioux și hibridul Bizon/10, aflate în ghivece și crescute în seră. Ca zaharuri exogene am folosit : glucoza, care există în mod curent în plante, și zaharoza, care reprezintă cea mai răspîndită formă de transport a zaharurilor în organismul vegetal. Introducerea soluțiilor de glucoză 10% și de zaharoză 10% a durat 18—19 zile, timp în care fiecare plantă a primit între 1,3 și 8,0 ml soluție. Pentru analize, materialul provenit de la 2—3 plante (s-a lucrat separat pe frunze, tulpini și rădăcini) s-a tăiat mărunt, s-a amestecat și s-au luat probe de cîte 2—3 g pentru dozarea azotului total, de 3—5 g pentru dozarea azotului proteic și de 2 g pentru determinarea masei uscate.

Azotul proteic și azotul total au fost determinate prin metoda Ivanov, indicată de Belozerski și Proskuriakov [14], mineralizarea fiind efectuată după indicațiile date de Slușanschi și colab. [15]. Rezultatele obținute au fost exprimate în mg N și raportate, în majoritatea cazurilor, la 1 g material uscat.

Am efectuat trei serii de experiențe, în iulie, mai și noiembrie.

REZULTATE

Rezultatele obținute sînt prezentate în tabelele 1, 2 și 3.

În tabela 1 sînt cuprinse unele rezultate ale experiențelor efectuate în iulie pe frunze, tulpini și rădăcini de tomate Sioux, în care s-a introdus glucoză, zaharoză, respectiv apă (la martor). Ele arată o scădere atît a azotului proteic, cît și a celui total la plantele în care s-a introdus glucoză, și mai ales la cele în care s-a introdus zaharoză. Această scădere este evidentă la frunze, mai slabă la tulpini, iar la rădăcini apare numai în unele cazuri.

Tabela 1

Experiențe efectuate în luna iulie
Azotul proteic și azotul total exprimate în mg/1 g substanță uscată de frunze, tulpini și rădăcini de tomate martor în care s-a introdus apă și de tomate în care s-a introdus glucoză 10% sau zaharoză 10%

În medie s-au introdus într-o plantă		Experiența I 5,5 ml glucoză 7,2 ml zaharoză		Experiența a II-a 6,8 ml glucoză 7,4 ml zaharoză		Experiența a III-a 6,2 ml glucoză 4,0 ml zaharoză	
Materialul vegetal		N proteic	N total	N proteic	N total	N proteic	N total
Frunze	martor	30,2	35,1	38,0	43,3	29,4	35,4
	glucoză	23,4	29,0	26,0	32,3	17,9	22,2
	zaharoză	16,5	20,0	23,1	25,8	18,6	22,5
Tulpini	martor	7,6	12,9	10,1	17,8	8,2	11,7
	glucoză	8,1	11,8	7,2	11,3	7,4	9,2
	zaharoză	5,3	9,3	6,5	7,9	8,1	10,4
Rădăcini	martor	16,0	21,1	16,0	24,6	18,1	24,7
	glucoză	14,0	21,3	14,2	19,8	17,3	20,6
	zaharoză	14,3	19,1	13,6	18,3	18,2	25,8

Tabela 2 prezintă rezultatele experienţelor efectuate în luna mai pe frunze, tulpini şi rădăcini de tomate Bizon/10, în care s-a introdus zaharoză.

Tabela 2

Experienţe efectuate în luna mai
Azotul proteic şi azotul total exprimate în mg/1 g substanţă uscată de frunze, tulpini şi rădăcini de tomate martor în care s-a introdus apă şi de tomate în care s-a introdus zaharoză 10%

În medie s-au introdus într-o plantă		Experienţa I		Experinţa a II-a		Experienţa a III-a	
		3,1 ml zaharoză		6,1 ml zaharoză		8,0 ml zaharoză	
Material vegetal		N proteic	N total	N proteic	N total	N proteic	N total
Frunze	martor	19,6	23,7	18,0	21,5	20,8	23,4
	zaharoză	19,2	20,5	17,5	20,9	20,1	24,4
Tulpini	martor	6,4	8,4	6,0	7,1	5,6	6,6
	zaharoză	4,8	6,8	6,6	8,2	5,4	7,0
Rădăcini	martor	14,4	16,5	14,9	17,5	14,4	16,9
	zaharoză	10,8	14,5	14,0	17,0	13,5	15,5

În tabela 3 sînt rezultatele experienţelor efectuate numai pe frunze de tomate, în care s-au introdus atît glucoză, cît şi zaharoză.

Tabela 3

Experienţe efectuate în luna noiembrie
Azotul proteic şi azotul total exprimate în mg/1 g material verde de frunze de tomate martor în care s-a introdus apă şi de tomate în care s-a introdus glucoză 10% sau zaharoză 10%

În medie s-au introdus într-o plantă	Experienţa I		Experienţa a II-a		Experienţa a III-a		Experienţa a IV-a	
	3,2 ml glucoză 2,1 ml zaharoză		2,9 ml glucoză 1,5 ml zaharoză		2,0 ml glucoză 1,4 ml zaharoză		2,0 ml glucoză 1,4 ml zaharoză	
Frunze	N proteic	N total	N proteic	N total	N proteic	N total	N proteic	N total
Martor	4,0	4,6	4,4	4,8	4,5	4,7	4,7	5,2
Glucoză	4,2	4,8	4,0	4,2	4,4	5,0	4,4	4,9
Zaharoză	4,2	4,8	4,6	5,1	4,0	4,7	4,4	5,2

Cu excepţia unor mici diferenţe care se constată la determinările de azot proteic şi azot total din frunzele plantelor în care s-a introdus zaharoză (tabela 2), din ultimele două tabele nu rezultă deosebiri între valorile diferitelor variante. În ultima tabelă, aceste rezultate ar putea fi justificate de faptul că plantele nu au primit decît cantităţi relativ mici de soluţie, iar celelalte, comparate cu datele din tabela 1, ne fac să credem că acest proces este influenţat de condiţiile în care cresc plantele (temperatură, lumină etc.) şi care nu au fost favorabile în cursul lunilor mai şi noiembrie.

CONCLUZII

Din rezultatele obţinute reiese deci că, în principiu, zaharurile exogene, şi anume glucoza şi zaharoza, introduse prin metoda capilară, timp îndelungat, în plante întregi de *Solanum lycopersicum*, provoacă scăderea azotului proteic şi a azotului total, atît din frunze, cît şi din tulpini. Această acţiune depinde însă de anumite condiţii în care cresc plantele (probabil

temperatura, intensitatea și timpul de expunere la lumină etc.), deoarece numai în cazul experiențelor efectuate în cursul lunii iulie efectul a fost evident, pe cînd la experiențele din lunile mai și noiembrie el a fost slab sau nu s-a manifestat de loc.

Scăderea valorilor azotului proteic și ale azotului total la plantele în care s-au introdus zaharuri ar putea să aibă legătură cu constatările făcute de Brad [7], care, studiind biochimia rezistenței la ger a cerealelor de toamnă, a găsit în frunzele și nodulul cu hipocotil al diferitelor plante că variația conținutului în zaharuri este inversă față de conținutul de proteină brută și că, în anii în care procentul de proteină brută crește, se produce o scădere a raportului zahăr total/proteină brută. Nu ar fi exclus ca zaharurile introduse de noi să inducă în plantă desfășurarea unor procese similare cu cele menționate mai sus.

Faptul că, în anumite condiții de viață ale plantelor, zaharurile exogene nu influențează asupra valorilor azotului proteic și azotului total ne dovedește că procesele complexe care au loc depind de aceste condiții. Pentru lămurirea problemei sînt necesare noi cercetări.

Prezentată la redacție la 27 ianuarie 1968

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. W. T. Jackson, *Effect of sugars on rate of elongation of root hairs of* **Agrostis alba** *L.*, Physiol. Plant. **15**, 675–682 (1962).
2. H. Duranton, R. Schantz, J. G. Kientz, *The influence of sugars on the synthesis of chlorophyll in calibrated explants of Topinanbour grown* **in vitro**, Chem. Abstr. **62**, 16637 c (1965).
3. P. B. Kaufman, J. M. Katz, M. E. Yoder, *Growth responses of Avena stem segments to various sugars*, Nature **196**, 1332–1333 (1962).
4. J. O. Ferguson, H. E. Street, S. B. David, *The promotion and inhibition of excised root growth by various sugars and sugar alcohols*, Ann. Bot. **22**, 513–523 (1958).
5. H. Ullrich, U. Heber, *The protective effect of sugar in the resistance to freezing in winter wheat*, Planta, **48**, 724–728 (1956).
6. U. Heber, *The role of sugars in cold hardiness*, Planta **52**, 144–172 (1958).
7. I. Brad, *Studiul comparativ al conținutului de proteină brută (azot total) la cereale de toamnă în timpul iernii*, St. cerc. biochim. **10**, 189–197 (1967).
8. F. V. Altergot, *Deistvie povișennih temperatur na rasteniia*, Izv. Akad. Nauk S.S.S.R., Seria biologhiceskaia, **1**, 66 (1963).
9. H. S. Mc Kee, *Nitrogen metabolism in leaves, Handbuch der Pflanzenphysiologie*, **VIII**, — *Der Stickstoffumsatz*, W. Ruhland, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 530–540 (1958).
10. S. N. Mathur, *Effect of glucose, nitrate and nitrite injections on protein synthesis in* **Anona squamosa** *Linn. leaves*, Agra Univ. J. Research Sci. 6, Pt. 1, 69–74 (1957).
11. H. B. Vickery, G. W. Pucher, *The loss of carbon from excised Rhubarb leaves during culture*, J. biol. Chem. **128**, 685–695 (1939).
12. H. B. Vickery, G. W. Pucher, C. S. Leavenworth, A. J. Wakeman, *The metabolism of amides in green plants*, J. biol. Chem. **125**, 527–538 (1938).
13. E. Macovschi, *Metoda capilară pentru introducerea compușilor chimici și produșilor biologici în corpul plantelor*, Com. Acad. R.P.R., **VIII**, 96 (1958).
14. A. N. Belozerski, N. I. Proskuriakov, *Prakticeskoe rubovodstvo po biohimii rastenii*, Moskva, 1951, 113.
15. H. Slușanschi, M. Șuțeanu, Al. Lozinschi, *Deproteinizarea și kjeldahlizarea compușilor organici cu azot*, St. cerc. biochim. **2**, 385–395 (1959).

THE INFLUENCE OF THE EXOGENOUS GLUCOSE AND SUCROSE ON THE PROTEIC AND TOTAL NITROGEN VALUES FROM *SOLANUM LYCOPERSICUM*

SUMMARY

In tomato plants grown in flower pots in hot-house, 10% glucose or 10% sucrose solutions were introduced during 18—19 days by means of the capillary method. The dosage of the proteic and total nitrogen in plants which received sugars, revealed in experiments achieved in best growing conditions (as light, temperature, etc.) lower values than those recorded in control plants in which only water was introduced. The decrease of the proteic and total nitrogen is more evident in the experiments with sucrose, it is more accentuated in leaves and less in stems; in roots it is noticed only some times.

ST. CERC. BIOCHIM. 11, 2, 117–120 (1968)

IZOENZIMELE CATALAZICE ŞI PEROXIDAZICE ÎN ENDOSPERMUL, SCUTELUL, TULPINIŢA ŞI RADICULA PLANTELOR DE PORUMB

I. BRAD, N. HURDUC, ST. NICULESCU şi ZOIŢA MARCU

Rezumat. — Au fost analizate izoenzimele peroxidazice şi catalazice din endospermul, scutelul, tulpiniţa şi radicula plantelor de porumb HD 208. S-au constatat diferenţieri în ceea ce priveşte numărul de fracţiuni, viteza de migrare, intensitatea activităţii enzimatice. Coloraţia cu amidoschwarz nu pune în evidenţă toate fracţiunile proteice cu activitate enzimatică.

Literatura semnalează în ultimul timp un număr din ce în ce mai mare de determinări referitoare la izoenzime. Aceste cercetări sînt necesare pentru lămurirea mecanismelor de răspuns ale plantelor faţă de factorii biotici şi abiotici, pentru lămurirea proceselor de reglare metabolică, pentru determinarea gradului de înrudire sau de diferenţiere al diferitelor soiuri şi specii, pentru determinarea segregării caracterelor la plante.

Referitor la prezenţa izoenzimelor peroxidazice la plante, literatura este relativ săracă. Semnalăm lucrarea lui Giaccomelli [3], care a cercetat izoenzimele peroxidazice din frunzele de orz provenite din seminţe iradiate şi neiradiate.

De asemenea, semnalăm lucrarea lui Siegel şi Galston [5], care cercetează izoperoxidazele de la *Pisum sativum*, şi a lui Moustafa [4], care cercetează izoperoxidazele nodozităţilor de leguminoase.

Cercetările noastre au fost executate pe endosperm, scutel, tulpiniţă şi radiculă de porumb, cu scopul de a constata dacă între aceste organe există diferenţe în ce priveşte izoenzimele catalazice şi peroxidazice.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele au fost executate cu seminţe de porumb HD 208. Boabele au fost selecţionate pentru a avea aceeaşi mărime şi au fost germinate în condiţii obişnuite. Cînd tulpiniţele au atins înălţimea de 5 cm, au fost recoltate.

După separarea organelor, s-a făcut o extracţie cu tampon veronal, pH 8,6, $\mu = 0{,}1$ (la un raport de extracţie de 1 parte ţesut la 2 părţi tampon). Pentru a împiedica activitatea enzimelor proteolitice, se adaugă bromat de sodiu (2), precum şi hiposulfit, pentru evitarea brunificării.

După extragerea la rece și centrifugare la 5000 r.p.m., timp de 10 minute, s-a procedat la separarea electroforetică, utilizînd 0,1 ml din supernatant.

Electroforeza s-a efectuat pe gel de agar, de concentrația 1,25% în tampon veronal, pH 8,6, $\mu = 0{,}1$. Plăcile aveau o lungime de 17,5 cm și o lățime de 3,5 cm, timpul de migrare fiind de 12 h, la o tensiune de 200 V și 2 mA/cm.

Ca electrolit, în cuve, s-a folosit tampon veronal, pH 8,6, $\mu = 0{,}1$.

Detectarea fracțiunilor izoenzimelor peroxidazice s-a făcut cu ajutorul reactivului cu benzidină [1]. Pentru punerea în evidență a fracțiunilor cu acțiune catalazică, s-a mărit timpul de expunere la tratarea cu acest reactiv care conține și apă oxigenată [1].

Zonele corespunzătoare izoenzimelor peroxidazice se colorează inițial în albastru, devenind brune după aproximativ o oră. Zonele cu activitate catalazică prezintă bule de oxigen în masa gelului.

Zimogramele au fost fotografiate prin transparență și reflexie, după care s-a trecut la evaluarea lor densitometrică.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

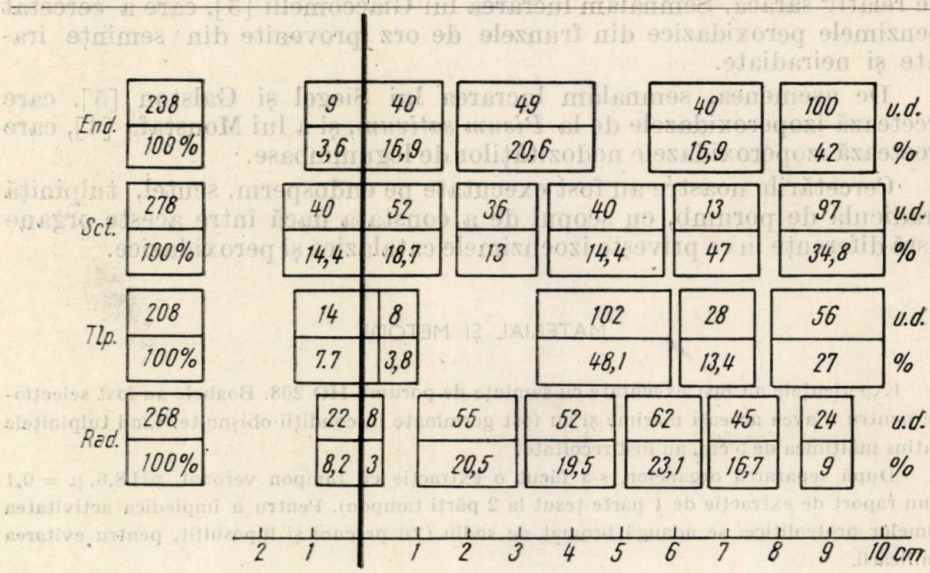
Rezultatele obținute sînt prezentate în tabela 1 și în figurile 1 și 2. Ele demonstrează existența unor diferențieri nete între cele patru organe analizate.

Se constată existența a patru izoenzime peroxidazice (fig. 1) la endosperm, șase la scutel, cinci la tulpiniță și șase la radiculă. La unele

Tabela 1

Variația intensității fracțiunilor peroxidazice exprimată în unități densitometrice și %. End. = endosperm. Sct. = scutel. Tip. = tulpiniță, Rad. = radiculă, u.d. = unități densitometrice

Organul	Unități densitometrice / %	+ Start − Zonele de etalare a fracțiunilor izoperoxidazice — Unități densitometrice / %						
End.	238	9	40	49	40	100	u.d.	
	100%	3,6	16,9	20,6	16,9	42	%	
Sct.	278	40	52	36	40	13	97	u.d.
	100%	14,4	18,7	13	14,4	47	34,8	%
Tip.	208	14	8	102	28	56	u.d.	
	100%	7.7	3,8	48,1	13,4	27	%	
Rad.	268	22	8	55	52	62	45	24	u.d.
	100%	8,2	3	20,5	19,5	23,1	16,7	9	%



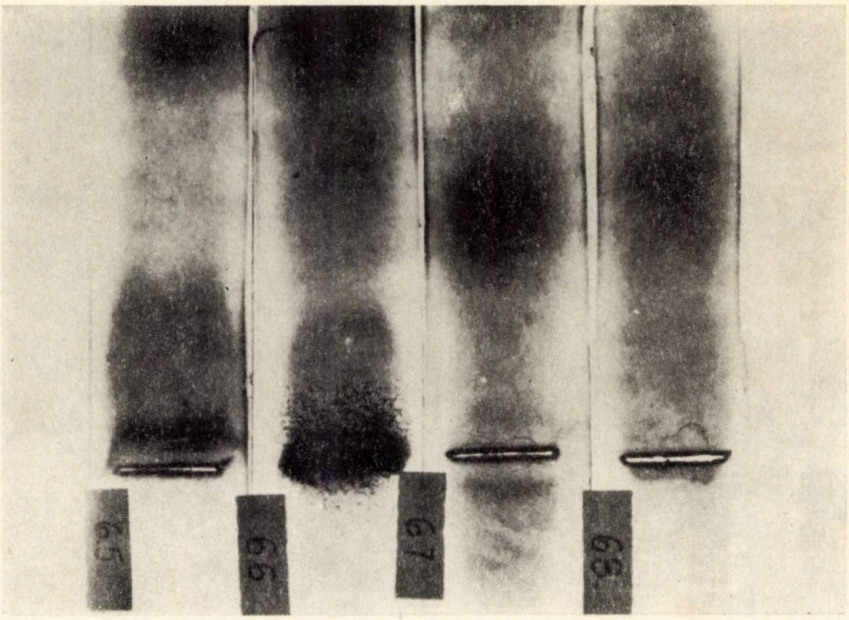


Fig. 1. — Izoenzimele peroxidazice la porumb, 65 = endosperm, 66 = scutel, 67 = tulpiniţă, 68 = radiculă.

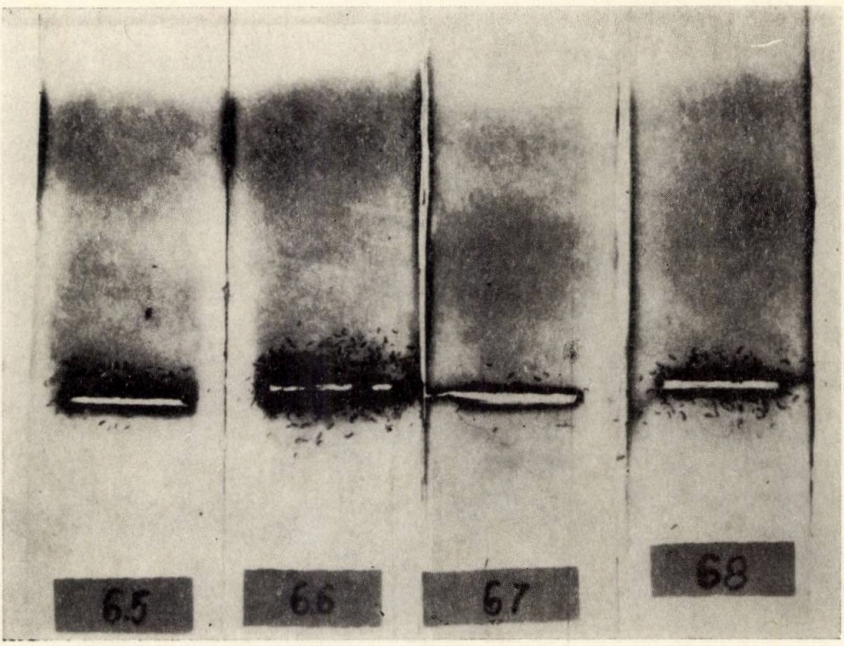


Fig. 2. — Izoenzimele catalazice la porumb (în zona cu bule), 65 = endosperm, 66 = scutel, 67 = tulpiniţă, 68 = radiculă.

dintre aceste organe se constată prezența unei fracțiuni anodice. Fracțiunile catodice se diferențiază prin intensitate și viteză de migrare. Se constată însă și existența unor fracțiuni cu viteză de migrare asemănătoare (vezi figurile).

În tabela 1 sînt prezentate, la dimensiuni naturale, zonele de etalare ale fracțiunilor în raport cu linia de start (în centimetri).

La endosperm, cele patru fracțiuni totalizează 238 de unități densitometrice (u.d.). Fracțiunea —1 (în ordinea de la start către catod) reprezintă 49 u.d., echivalînd cu 20,6%; fracțiunea —2 corespunde la 49 u.d. (20,6%); fracțiunea —3 reprezintă 40 u.d. (16,9%), iar fracțiunea —4 reprezintă 100 u.d. (42%).

La celelalte organe se constată că intervalul de etalare este diferit, valoarea totală în u.d. nu se deosebește apreciabil, valoarea procentuală a fracțiilor însă diferențiindu-se foarte mult. Din tabelă și din figuri reiese că anumite fracțiuni sînt comune diferitelor organe, avînd aceeași viteză de migrare, dar o intensitate diferită. Astfel, la endosperm și scutel sînt mai intense fracțiile —4, respectiv —5. La tulpiniță în schimb, fracțiunea de aproximativ aceeași intensitate este —2. La rădăciniță, fracțiunea cea mai intensă (deși mult mai slabă decît cele discutate mai sus) este —3. De asemenea, scutelul, endospermul și tulpinița prezintă multe fracțiuni comune: fracțiunea —1 apare la toate cele trei organe, fracțiunile —3 și —4 de la scutel sînt comune cu fracțiunile —2 și —3 de la tulpiniță, iar fracțiunea —4 de la endosperm, cu —5 de la scutel și —4 de la tulpiniță.

În tabelul 1 s-au trecut fracțiuni notate +1 în raport cu startul la toate organele. Datorită fenomenelor de difuzie și endosmoză din zona startului, nu le putem considera însă în toate cazurile ca fiind fracțiuni anodice.

Astfel, la endosperm considerăm că, în realitate, cele două fracțiuni situate de o parte și de alta a startului constituie de fapt o fracțiune catodică.

La scutel însă, ținînd seama de distanța mare de migrare cît și de valoarea mare (exprimată în u.d.), considerăm totuși că este vorba de o fracțiune anodică.

La tulpiniță reiese clar existența unei fracțiuni catodice, net diferențiată de cea anodică.

La radiculă considerăm că zonele de migrare din jurul startului constituie în realitate o fracțiune anodică.

În ceea ce privește catalaza, în condițiile noastre de lucru, se constată activitate catalazică doar în zona startului, de o parte și de cealaltă a lui (fig. 2). Din considerentele enunțate mai sus, nu putem vorbi de fracțiuni anodice și catodice (cel puțin pentru condițiile noastre de lucru).

Se constată că maximul de activitate îl prezintă scutelul, urmat de endosperm și radiculă.

Pentru condițiile noastre de lucru, catalaza manifestă tendința de a migra spre polul (—) în raport cu startul.

Colorarea proteinelor cu amidoschwarz 10 B a dus la constatarea că anumite fracțiuni nu se pot pune în evidență cu acest reactiv. De asemenea, zona colorată intens cu amidoschwarz nu corespunde totdeauna cu zona celei mai intense peroxidaze.

CONCLUZII

1. Endospermul, scutelul, tulpiniţa şi radicula plantulelor de porumb HD 208 prezintă 4—6 fracţiuni peroxidazice şi o fracţiune catalazică.

2. Organele se diferenţiază între ele ca număr de fracţiuni, ca viteză de migrare şi ca activitate enzimatică a acestora.

3. Coloraţia cu amidoschwarz nu pune întotdeauna în evidenţă zonele cu activitate peroxidazică.

Prezentată la redacţie la 13 octombrie 1967

Secţia de fiziologie şi biochimie vegetală
Institutul de cercetări pentru cereale şi plante tehnice,
Fundulea — Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. A. N. Boiarkin, *Bistrii metod opredelenia activnosti perocsidazi*, Biohimia, **16**, 352—357 (1951).
2. V. Gheţie, *Cercetări asupra proteinelor din fasole (phaseolus vulgaris). II. Modificarea proteineor din sămînţă în timpul germinaţiei*, St. cerc. biochim. **2**, 293—298 (1959).
3. M. Giacomelli, *Peroxidase isoensymes in barley leaves from irradiated seeds*, Nature, London **213**, 1265—1266 (1967).
4. E. Moustafa, *Peroxidase isoensymes in root modules of various leguminous plants*, Nature, London 199, 1189 (1963).
5. B. Z. Siegel, A. W. Galston, *The isoperoxidases of Pisum sativum*, Plant Physiol., **42**, 221—226 (1967).

THE PEROXIDASIC AND CATALASIC ISOENZYMES IN MAIZE ENDOSPERM, SCUTELUM, PLUMULE AND RADICLE

SUMMARY

The peroxidasic and catalasic isoenzymes in endosperm, scutelum, plumule and radicle of maize seedlings HD 208 were analysed.

Differences in the number of fractions, migration velocity and enzymatic activity were found.

Amidoschwarz is not a sensible reagent for all protein fractions possessing enzymatic activity.

ST. CERC. BIOCHIM. II, 2, 121–126 (1968)

ANTICORPI ANTI-DANS* ŞI INTERACŢIUNEA LOR CU HAPTENA FLUORESCENTĂ

LUCIA BUZILĂ

Rezumat. — S-au obţinut anticorpi anti-DANS prin hiperimunizarea prelungită a iepurilor cu DANS legat de albumină serică umană şi de proteine serice umane. Anticorpii anti-DANS interacţionează cu haptena, determinînd o creştere a fluorescenţei cu 19—59%. Ei precipită în gel ovalbumina, globulinele de iepure şi serul de pasăre de care s-a fixat DANS.
Anticorpii anti-DANS aparţin imunoglobulinelor din clasa IgG, fiind prezenţi atît în fracţiunile IgG I cît şi IgG II, separabile prin cromatografie pe DEAE-celuloză.

Prepararea unor anticorpi capabili să lege în zona lor de combinare substanţe marcate a fost realizată de Singer şi colab. [2], [3]. Prin tehnica marcării prin afinitate (*affinity labeling*), ei au reuşit să ataşeze de zona de combinare a anticorpilor anti-DNP[1] o substanţă înrudită chimic cu haptena, marcată cu tritium şi care posedă o grupare diazo capabilă să formeze o legătură covalentă cu aminoacizii din zona de combinare. Anticorpii cu zona de combinare marcată sînt apoi fragmentaţi, pentru identificarea peptidelor care derivă din zona activă.

În această lucrare ne-am propus să lărgim sfera de aplicare a metodei de marcare prin afinitate şi să preparăm anticorpi capabili să fixeze în zona lor de combinare substanţe fluorescente. Am recurs la DANS, ca haptenă şi agent de marcare, din următoarele motive :

a. Se poate utiliza DANS atît la imunizare (fixat pe o proteină suport), cît şi la marcarea prin afinitate (ca atare sau fixat pe celită).

b. Se cunoaşte distribuţia DANS-ului în molecula de IgG fluorescentă de iepure [4], [5], [6].

c. Cantitatea de fluorocrom legată poate fi variată în procesul de conjugare (sub influenţa pH-ului, temperaturii sau timpului de reacţie).

d. Anticorpii cu zona de combinare fluorescentă pot servi atît la localizarea intramoleculară şi determinarea compoziţiei chimice a zonelor active, cît şi pentru determinarea configuraţiei lor spaţiale şi a parametrilor fizico-chimici ai reacţiei haptenă-anticorp (prin măsurători fluorometrice).

---

* DANS = acidul 1-dimetilaminonaftalen-5-sulfonic (substanţă fluorescentă capabilă să se fixeze chimic de proteine prin intermediul unei legături sulfonamidice (1).

[1] = 2,4-dinitrofenil.

Lucrarea prezentă descrie modul de obținere a anticorpilor anti-DANS, precum și cîteva din proprietățile lor fizico-chimice și imunochimice.

MATERIAL ȘI METODE

Imunizarea iepurilor cu conjugate fluorescente. S-a cuplat clorura de DANS de albumina serică umană sau de proteine serice umane (ser sanguin), printr-o tehnică descrisă anterior (1). Conjugatele, purificate prin gel-filtrare pe Sephadex G—25, s-au administrat în asociație cu adjuvant Freund sau hidroxid de aluminiu, la două loturi de cîte 6, respectiv 12 iepuri fiecare.

După circa 6 săptămîni de la începerea imunizării s-au testat serurile și s-au menținut în experiență numai animalele care prezentau un răspuns imunologic satisfăcător. Iepurii imunizați cu DANS-albuminà serică umană au primit între 65 și 120 mg antigen, în injecții repetate cel puțin o dată pe săptămînă, timp de 3—8 luni. Animalele inoculate cu DANS-proteină serică au primit 90 mg antigen, fracționat în doze de 2,5 mg, administrate de două ori pe săpt ămînă, timp de 5 luni. Sîngerările s-au făcut la 7—12 zile de la ultima injecție.

Determinările fluorometrice. S-a întrebuințat un microfluorometru Shimadzu Kotaki (Japonia)[2] prevăzut cu filtrele corespunzătoare spectrului de absorbție și emisie caracteristic DANS-ului (325 mμ și 525 mμ).

Modul de lucru : la 4,5 ml soluție de anticorp (2 mg/ml) se adaugă 0,5 ml dintr-o soluție de acid 1-dimetilaminonaftalen-5-sulfonic (0,02 mg/ml). Se amestecă și se citește fluorescența imediat și după 10 minute. Se repetă determinarea, utilizînd în locul anticorpilor o soluție de IgG normală și soluția de bază în care s-au dizolvat proteinele (tampon fosfat 0,05 M pH 8,0 cu ClNa 0,145 M). Diferența de fluorescență dintre soluția de anticorp și cea de IgG normală, corectată prin scăderea fluorescenței soluției de bază, a fost considerată ca o măsură a activității anticorpilor anti-DANS.

Imunoelectroforeza și dubla difuzie. S-a utilizat tehnica lui Scheidegger [7], pe gel de agaroză 1% în tampon veronal-veronal sodic, de pH 8,6 și putere ionică 0,05 în cuvă și 0,016 în plăci. Potențialul a fost de 20 V/cm, intensitatea n-a depășit 1 mA/cm, iar timpul de migrare a variat în jur de 90 min. S-au folosit seruri imune de capră anti ser de iepure și seruri de cobai anti IgG de iepure [8].

Fluoroimunoelectroforeza [9] și radioimunoelectroforeza [10] s-au efectuat cu insulină dublu marcată, atît cu I^{131} cît și cu DANS. După uscare, plăcile s-au pus în contact cu un film pentru raze X și s-au developat după 3 săptămîni. S-au confruntat autoradiografiile cu plăcile examinate în U.V. și apoi s-au colorat cu amidoschwarz 10 B.

Pentru dubla difuzie s-a utilizat DANS fixat pe proteine serice de iepure sau de pasăre. Marcarea s-a făcut în condițiile descrise mai jos pentru insulină, iar analiza s-a efectuat pe geluri de agaroză 1% în soluție de NaCl 0,145 N.

Marcarea insulinei cu DANS și I^{131}. Se dizolvă 100 mg insulină de bou (Biofarm, București, 23 u.i./mg) în 5 ml tampon carbonat-bicarbonat 0,05 M, pH 9,2. Se adaugă, sub agitare, 0,1 ml soluție acetonică de clorură de DANS (5 mg), se continuă agitarea 30 min și se centrifughează amestecul. Supernatantul se trece peste Sephadex G—25, echilibrat și eluat tot cu tampon carbonat-bicarbonat de pH 9,2, însă 0,1 M. Piscul care părăsește primul coloana conține insulina fluorescentă și a fost iodurat cu 1 mCi Na I^{131} utilizînd metoda de oxidare cu azotit [11]. Iodul nelegat s-a eliminat prin gel-filtrare peste Sephadex G—25, utilizînd o soluție de NaCl 0,145 M (fig. 1). S-a calculat procentul de iod legat de insulină (35%), măsurînd activitatea specifică a soluției după adăugarea iodului radioactiv (activitate inițială) și după îndepărtarea

[2] Mulțumim pe această cale colegului G. Haralambie de la Centrul Sportiv „23 August" pentru bunăvoința cu care ne-a pus la dispoziție microfluorometrul.

radioiodului nelegat de insulină (activitate finală). Soluţia de insulină radioactivă folosită a avut o activitate specifică cuprinsă între 5 şi 10 μCi/mg insulină. Măsurătorile s-au făcut cu un contor β cu fereastră subţire.

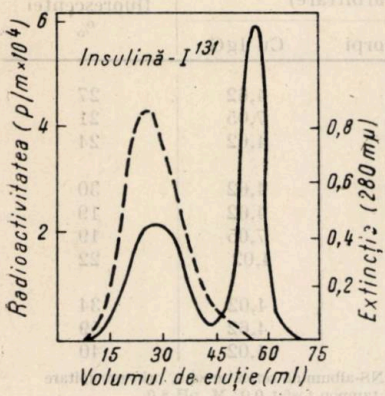


Fig. 1. — Separarea DANS-insulinei radioactive de radioiodul liber. Linia continuă : = radioactivitate. Linia întreruptă = extincţie la 280 mμ.

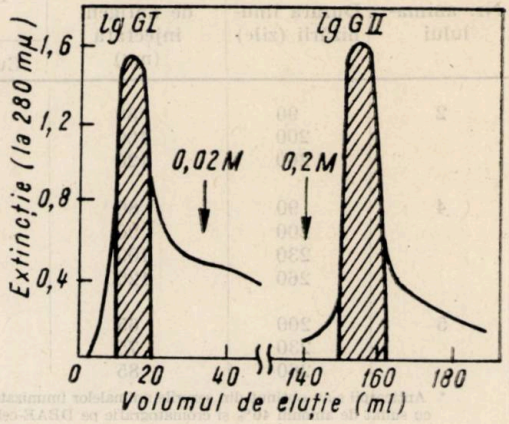


Fig. 2. — Fracţionarea IgG de iepure prin cromatografie pe DEAE-celuloză.

Izolarea anticorpilor anti-DANS. Serurile cu anticorpi anti-DANS s-au contopit şi au fost precipitate cu sulfat de amoniu la 40% saturare. Precipitatul s-a dizolvat în apă distilată şi s-a dializat faţă de tampon fosfat 0,02 M, pH 8,0. Dializatul s-a fracţionat pe coloană de DEAE-celuloză, utilizînd tot tamponul fosfat de pH 8,0, dar în două concentraţii : 0,02 M şi 0,2 M (fig. 2).

Eluatele din fiecare din zonele haşurate s-au contopit şi s-au analizat ca atare sau după dializa faţă de apă distilată şi liofilizare.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Răspunsul imun al iepurilor faţă de DANS este, în general, slab Astfel, din 6 iepuri imunizaţi cu DANS legat de albumina serică umană, numai 3 au produs anticorpi specifici, iar din 10 iepuri la care DANS s-a administrat legat de proteina serică totală, numai 3 au răspuns satisfăcător. Nu s-au obţinut anticorpi specifici la grupe de cîte 3—4 iepuri imunizaţi cu DANS legat prin intermediul legăturii sulfonamidice de γ-globulină bovină sau ovalbumină sau cu un derivat înrudit cu DANS (acidul 1-aminonaftalen-5-sulfonic) legat de γ-globulina bovină prin intermediul unei grupări diazo. Deci, se poate conchide mai degrabă că nucleul naftalenic nu are o antigenicitate satisfăcătoare pentru iepure, decît că suportul proteic folosit sau legătura chimică dintre haptenă şi suport n-au fost corespunzătoare.

Prezenţa anticorpilor anti-DANS se evidenţiază printr-o creştere (*enhancement*) a fluorescenţei soluţiilor de DANS cu care sînt puşi în contact (tabela).

Tabela

Variația fluorescenței în urma interacțiunii DANS cu anticorpi specifici*

Nr. animalului	Durata imunizării (zile)	Cantitatea de antigen injectată (mg)	Fluorescență (în unități arbitrare)		Creșterea fluorescenței %
			Cu anticorpi	Cu IgG	
2	90	80	5,82	4,62	27
	200	100	8,58	7,05	21
	260	120	5,79	4,62	24
4	90	80	6,03	4,62	30
	200	90	5,54	4,62	19
	230	100	8,42	7,05	19
	260	120	4,93	4,02	22
5	200	65	5,40	4,02	34
	230	75	7,36	4,62	59
	260	85	5,63	4,02	40

* Anticorpii s-au obținut din serurile animalelor imunizate cu DANS-albumină serică umană, prin precipitare cu sulfat de amoniu 40% și cromatografie pe DEAE-celuloză în tampon fosfat 0,02 M, pH 8,0.

Valoarea creșterii fluorescenței se păstrează constantă în cursul rapelurilor, ceea ce arată că prin continuarea hiperimunizării, după schema aplicată de noi, sinteza anticorpilor anti-DANS nu mai este stimulată, ci se menține la un nivel constant.

Creșterea fluorescenței se poate explica [12], [13] prin scăderea capacității fluorocromului de a dispersa energia de excitație în rotație internă, în urma atașării sale de molecula voluminoasă a anticorpului.

Prezența anticorpilor anti-DANS poate fi evidențiată și prin tehnica fluoro- și radioimunoelectroforetică (fig. 3).

Făcînd migrarea electroforetică a antiserului ce conține anticorpi anti-DANS și dezvoltînd liniile de precipitare specifice cu serul de capră antiiepure sau cu cel de cobai anti-IgG, primul antiser dă linii de precipitare pentru IgG și IgM, iar al doilea reacționează numai cu IgG.

După îndepărtarea excesului de reactanți printr-o spălare de două zile, în șanțul central se introduce soluția de insulină dublu marcată. Datorită DANS din moleculă, insulina se fixează pe liniile de precipitare care conțin anticorpi anti-DANS, iar acestea devin fluorescente, respectiv radioactive. Comportarea imunoelectroforetică, prezentată în figura 3, arată că, spre deosebire de serurile de iepure martor, serurile anti-DANS leagă fluorescența și radioactivitatea pe linia IgG. Deci, anticorpii anti-DANS sînt de tip IgG. Aceste IgG de iepure se găsesc atît în piscul ce se eluează de pe DEAE-celuloză la 0,02 M (pure), cît și în cel ce se eluează la 0,2 M (împreună cu alte tipuri de impurități de natură globulinică, ca γM, γA) (fig. 2). Cele două IgG au aceeași antigenicitate, dar diferă prin mobilitatea lor electroforetică (fig. 4).

Posibilitatea separării IgG de iepure în două fracțiuni distincte, prin eluție succesivă de pe DEAE-celuloză la două concentrații saline, a fost semnalată și de Steiner și Lowey [14]. Autoarele eluează componentul IgG I (cu mobilitate electroforetică mai mică) la o concentrație 0,06 M a tamponului Tris (pH 8,0), iar componentul IgG II (cu mobilitate electroforetică mai mare) apare dacă se adaugă tamponului NaCl 0,06 M.

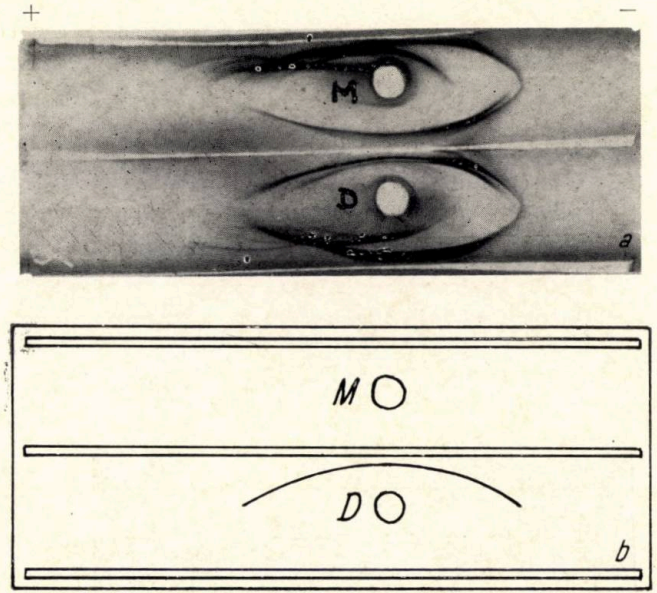


Fig. 3. — Evidențierea anticorpilor anti-DANS cu linia de precipitare a IgG de iepure. *a* = colorație cu amidoschwarz ; *b* = autoradiografie și examen în U.V. ; *M* = ser de iepure neimunizat ; *D* = ser de iepure imunizat cu DANS-albumină umană. În șanțuri s-a introdus ser de cobai anti IgG iepure (în mijloc), precum și ser de capră antiser total iepure (spre margine).

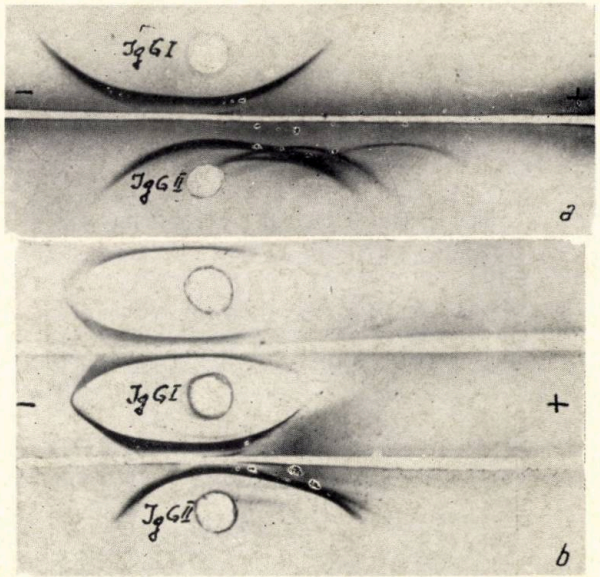


Fig. 4. — Analiza imunoelectroforetică a IgGI și IgGII și localizarea anticorpilor anti-DANS în aceste două fracțiuni. *a* = evidențierea celor două fracțiuni cu serul imun de capră antiser total de iepure [colorație cu amidoschwarz] ; *b* = evidențierea celor două fracțiuni cu ajutorul serului imun de cobai anti-IgG de iepure [colorație cu amidoschwarz] ;

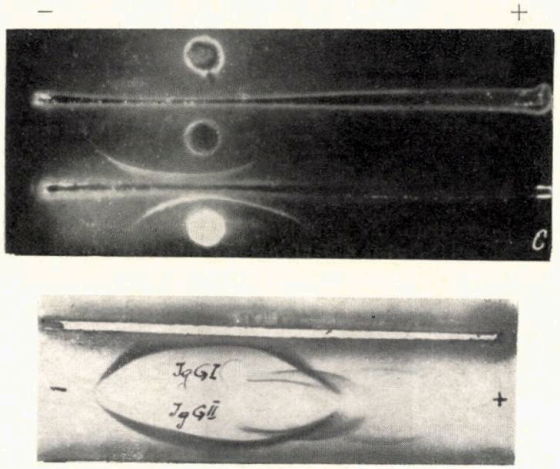


Fig. 4. — *c.* autoradiografia; *d.* identitatea dintre linia pentru IgG I și IgG II.

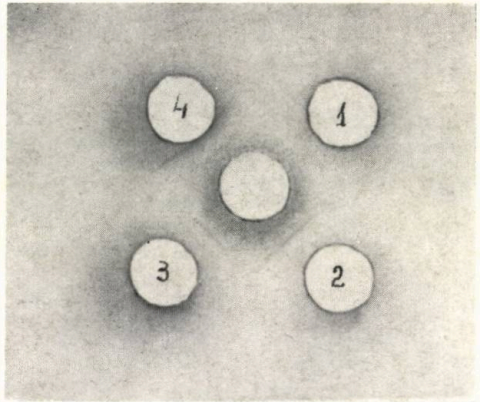


Fig. 5. — Reacția de precipitare a anticorpilor anti-DANS cu DANS legat de proteine din serul de pasăre. În godeul central s-au introdus proteinele de pasăre marcate cu DANS (conc. proteică 2g%). *1* = ser martor; *2*, *3*, *4* = serurile celor 3 iepuri care au fost imunizați cu DANS-proteine serice umane.

Prin fluoro- și radioimunoelectroforeză s-a arătat că ambele subclase de IgG au capacitatea de a fixa DANS atît pe suport de insulină radioactivă, cît și pe suport de γ-globulină bovină. Deci, anticorpii anti-DANS aparțin celor două subclase ale IgG de iepure identificate cu această ocazie.

În sfîrșit, anticorpii anti-DANS sînt capabili să reacționeze printr-o reacție de precipitare în mediul gelificat cu DANS fixat de alte suporturi decît cele utilizate la imunizare (de ex. ovalbumina, globulinele de iepure și proteina de pasăre (fig. 5)).

Reacția de precipitare în mediu gelificat a fost aplicată și pentru precipitarea anticorpilor anti-DANS din serurile imune. Cu această ocazie s-a putut determina că concentrația anticorpilor anti-DANS este sub 200 μg/ml, ceea ce arată de la început că iepurii nu pot servi ca animale furnizoare de anticorpi anti-DANS în cantitate care să permită investigarea structurii zonelor active de combinare.

CONCLUZII

Administrarea de DANS legat de diferite suporturi proteice determină la iepuri apariția în sînge a anticorpilor specifici anti-DANS. Acești anticorpi interacționează cu acidul 1-dimetilaminonaftalen-5-sulfonic, determinînd o creștere a fluorescenței, și pot precipita în mediu gelificat o proteină diferită de cea utilizată la imunizare, dacă de ea se atașează DANS.

Anticorpii anti-DANS formați aparțin imunoglobulinelor din clasa IgG. Ei se găsesc distribuiți în ambele subclase de IgG I și II, delimitate prin comportarea lor cromatografică și imunoelectroforetică.

Predată la redacție la 26 septembrie 1967

Sectorul de imunochimie, Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România, București

BIBLIOGRAFIE

1. H. D. Shell, V. Gheție, *Die Fluoreszenzmarkierung der Serumeiweisstoffe mit 1-Dimethylamino-Naphtalin-5-Sulfonsäurechlorid und Reinigung der erhaltenen Konjugate*, Rev. roum. biochim. **1**, 203 (1964).
2. J. Lenard, S. J. Singer, *Specificity of affinity labeling of anti-DNP antibodies*, Immunochemistry **3**, 51, 1966.
3. S. J. Singer, Russell F. Doolittle, *Antibody active sites and immunoglobulin molecules*, Science **153** : 13 (1966).
4. C. Șelariu, V. Gheție, S. Mihăescu, *Hidroliza cu papaină a γ_2-globulinelor și anticorpilor fluorescenți de iepure*, St. cerc. biochim. **8**, 99 (1965).
5. S. Mihăescu, *Distribution of 1-dimethylaminonaphtalene-5-sulfonic acid in the polypeptide chains of rabbit γG*, Rev. roum. Biochim. **4**, 41 (1967).
6. V. Gheție, S. Mihăescu, C. Șelariu, *The fragmentation of fluorescent rabbit IgG and the intramolecular localization of label*, VII-th International Congress of Biochemistry, Tokyo, 1967.
7. J. J. Scheidegger, *Une microméthode de l'immunoélectrophorese*, Int. Arch. Allergy **7**, 103 (1955).

8. S. MIHĂESCU, V. GHEȚIE, *Variații individuale în producerea anticorpilor precipitanți la cobaii inoculați cu γ-G-globulină sau proteine serice de iepure*, St. cerc. biochim. **10**, 273 (1967).
9. V. GHEȚIE, *Fluoro-imunoelectroforeza*, St. cerc. biochim. **9**, 359 (1966).
10. Y. YAGI, P. MAIER, D. PRESSMAN, *Immunoelectrophoretic identification of guinea pig anti-insulin antibodies*, J. Immunol. **89**, 736 (1962).
11. A. JOHNSON, E. D. DAY, D. PRESSMAN, *The effect of iodination on antibody activity*, J. Immunol. **84**, 253 (1960).
12. M. WINKLER, *A molecular probe for the antibody site*, J. mol. Biol. **4**, 118 (1962).
13. A. A. AMKRAUT, *Determination of antibody-hapten binding constant by fluorescent enhancement*, Immunochemistry **1**, 231 (1964).
14. L. A. STEINER, S. LOWEY, *Optical rotatory dispersion studies of rabbit γ G-immunoglobulin and its papain fragments*, J. biol. Chem. **241**, 231 (1966).

ANTI-DANS ANTIBODIES AND THEIR INTERACTION WITH THE FLUORESCENT HAPTEN

SUMMARY

Anti-DANS (1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonic acid) antibodies by a long time hyperimmunization of rabbits with DANS bound on bovine serum albumin and on human serum proteins were obtained.

The anti-DANS antibodies interaction with the hapten yields to an enhancement of fluorescence of 19—59 per cent. They precipitate in gel the ovalbumin and the rabbit globulins as well as the chicken serum on which DANS was fixed.

The anti-DANS antibodies belong to IgG class of immunoglobulins being present both in IgG I and in IgG II fractions separated by chromatography on DEAE-cellulose.

ST. CERC. BIOCHIM. 11, 2, 127–131 (1968)

MODIFICĂRI BIOCHIMICE ŞI FIZIOLOGICE LA PORUMBUL HD 208, SUB ACŢIUNEA FOLCISTEINEI OERIU „P"

H. CHIRILEI, S. OERIU, M. DOROBANŢU, G. CURTICOPEANU şi I. OERIU

Rezumat. — Grupările SH eliberate enzimatic de folcisteină influenţează în sens pozitiv respiraţia, transpiraţia şi valoarea vitaminelor PP şi C. Modificările biochimice sînt însoţite de o vigurozitate mai mare a plantelor tratate şi de o dezvoltare mai accentuată a sistemului radicular.

Ideea de a stimula potenţialul chimic şi energetic al organismului vegetal, în scopul de a mări valoarea calitativă şi cantitativă a produselor sale, reprezintă unul din factorii ce stau la baza folosirii produselor naturale şi sintetice, cărora li se atribuie un rol de biostimulator în procesele metabolice [1], [2], [3].

Din grupa biostimulatorilor, substanţe proprii organismului, unele, cum sînt hormonii, intervin direct un timp dat de la administrarea lor, fără să stimuleze şi secretarea de hormoni biologic activi; altele intervin direct în procesele metabolice, stimulînd creşterea şi dezvoltarea organismului vegetal. Din acest al doilea grup de substanţe face parte folcisteina Oeriu „P" (FOP). În organism, această substanţă pune în libertate, pe cale enzimatică, grupări SH cu rol în procesele de oxidoreducere, în sinteza proteică, în reglarea echilibrului biochimic [10], [11], [12], [13].

În lucrarea de faţă ne-am propus studiul acţiunii acestui biostimulator asupra creşterii şi dezvoltării porumbului HD 208, cultivat în casa de vegetaţie a Institutului agronomic „Nicolae Bălcescu".

MATERIAL ŞI METODĂ

Seminţe de porumb HD 208; vase de vegetaţie de 9 kg Mitcherlich; FOP în fiole de 5 cm^3 în soluţie de 5%.

Experienţa cuprinde patru variante, 60 de plante în 15 repetiţii ale căror seminţe au fost tratate 24 de ore cu FOP în variate concentraţii: 1/25 000 = V_2; 1/50 000 = V_3; 1/100 000 = = V_4. Martorul (V_1) a fost tratat în aceleaşi condiţii cu apă (tabela 1).

S-au făcut determinări de: aminoacizi, după Hais şi Macek (8) şi Lederer (citat de (9)); glucide, vitamina C şi catalaza, după Davidescu şi colab. (5); vitaminele B_1, B_6 şi PP, după

Guilleman (7); acid ascorbicoxidaza, după Porolotskaya şi Sedenko (14), respiraţia, după Umbreith (15); transpiraţia, după Sachs; glutation redus şi oxidat, după Woodford şi Fry (16). S-a urmărit în timp şi înălţimea plantelor.

Tabela 1

Seminţe tratate cu apă distilată sau FOP în diferite doze

Produsul tratat	Varianta	Apă	FOP doza	Durata (ore)
Seminţe de porumb HD 208	V_1 (martor)	+	—	24
	V_2	—	1/25 000	24
	V_3	—	1/50 000	24
	V_4	—	1/100 000	24

REZULTATE

Intensitatea respiraţiei şi a transpiraţiei variantelor tratate faţă de martor apare în tabela 2.

Efectul stimulator al folcisteinei se reflectă şi asupra creşterii în înălţime (tabela 2) şi asupra dezvoltării mai accentuate a sistemului radicular (fig. 1).

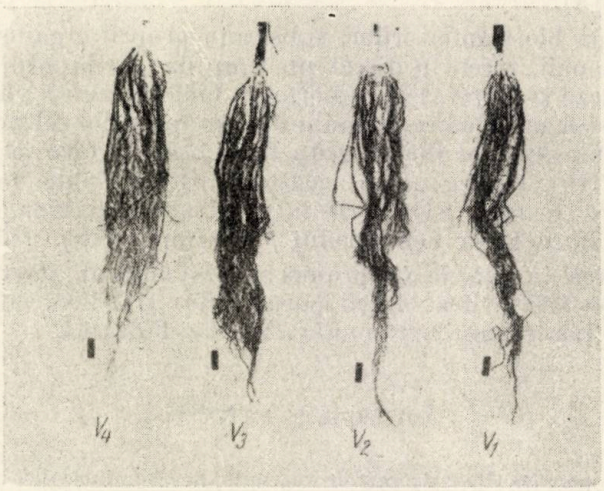


Fig. 1

La varianta V_4, care pare mai influenţată, se observă în frunze o creştere a raportului SH/SS al glutationului redus/glutation oxidat, o creştere a respiraţiei şi transpiraţiei şi a vitaminelor C şi PP, cu rol însemnat în procesele de oxidoreducere (tabela 3).

Tabela 2

Valorile medii (din 15 repetiții) obținute în urma observațiilor fiziologice și morfologice la plantele de porumb ale căror semințe au fost supuse tratamentului cu folcisteina Oeriu „P"

Varianta	Respirația și transpirația din frunze						Înălțimea plantelor (cm)	
	cm^3 CO_2/h/100 g			g/h/%				
	20. VI	12. VII	16. VIII	20. VI	12. VII	16. VIII	20. VI	16. VIII
V_1 — martor	16,5	25,7	36,1	3,6	4,5	5,29	58,3	70
V_2 — 1/25 000	18,0	29,3	50,4	4,2	4,9	4,12	55,5	73
V_3 — 1/50 000	16,7	31,4	39,5	5,9	5,3	5,52	65,7	83
V_4 — 1/100 000	19,5	28,5	49,0	4,2	4,9	7,05	64,3	88

Tabela 3

Valorile medii (în substanță uscată) ale unor componente biochimice din frunze, tulpină și rădăcină de porumb HD 208, recoltat în 20.VI.1967, ale cărui semințe au fost tratate în casa de vegetație cu folcisteina Oeriu „P"

Produsul analizat	Varianta	Doză FOP	Aminoacizi (mg %)						Glucide (g %)		
			glutamină	acid aspartic	treonină	alanină	ac.-α aminobutiric	valină	zaharoză	glucoză	fructoză
Frunze	V_1(M)	—	24,0	147	36,0	94,0	39,0	63,0	0,60	0,20	0,10
	V_2	1/25 000	26,0	139	34,0	98,0	42,0	65,0	0,60	0,20	0,10
	V_3	1/50 000	27,0	150	40,0	90,0	42,0	60,0	0,60	0,20	0,10
	V_4	1/100 000	25,0	156	38,0	96,0	43,0	66,0	0,60	0,30	0,10

			Vitamine				Enzime			Glutation		
			B_1 γ% g	B_6 γ% g	C mg % g	PP γ/g	acid ascorbicoxidaza (mg C%)	polifenol oxidaza (mg %)	catalaza (g H_2O_2%)	Gl_{SH}	Gl_{SS}	Gl_T
Frunze	V_1	—	28,80	33,90	8,15	46	233,75	33,44	6,96	40	61	101
	V_4	1/10 000	30,40	32,43	10,63	56	210,00	48,30	7,68	113	76	189

			Aminoacizi (mg %)						Glucide (g %)		
			glutamină	acid aspartic	treonină	alanină	ac. α-aminobutiric	valină	zaharoză	glucoză	fructoză
Tulpină	V_1	—	30,0	160	29,0	67,0	33,0	42,0	1,20	0,60	0,40
	V_2	1/25 000	32,0	166	31,0	70,0	36,0	41,0	1,30	0,80	0,50
	V_3	1/50 000	35,0	159	27,0	65,0	30,0	42,0	1,60	0,90	0,70
	V_4	1/100 000	30,0	172	29,0	63,0	35,0	40,0	1,30	0,70	0,50
Rădăcină	V_1	—	25	46	24	37	23	20	0,30	0,40	0,20
	V_2	1/25 000	32	50	27	39	27	18	0,60	0,50	0,20
	V_3	1/50 000	38	52	22	38	20	20	0,40	0,40	0,20
	V_4	1/100 000	34	49	28	40	25	21	0,30	0,40	0,20

DISCUŢII

Modificările fiziologice şi morfologice cuprinse în tabela 2 şi în figura 1 oglindesc observaţiile privind dezvoltarea plantelor.

Creşterea raportului glutation redus/glutation oxidat (SH/SS) reliefează acţiunea grupărilor SH ale folcisteinei asupra mobilizării rezervelor cu rol în creşterea şi dezvoltarea plantei. Accentuarea proceselor de reducere faţă de cele de oxidare este însoţită şi de o intensificare a respiraţiei şi transpiraţiei şi de o acumulare de vitamine C şi PP.

Dacă la aceste date se adaugă observaţiile fiziologice şi morfologice făcute de Davidescu şi colab. (6) la porumbul Tuxpeno, urmărit un timp mai îndelungat în casa de vegetaţie a Institutului „Nicolae Bălcescu", apare evident rolul grupărilor SH asupra creşterii şi dezvoltării porumbului, asupra măririi recoltelor şi valorii calitative a boabelor de porumb obţinute de la plantele ale căror seminţe au fost supuse tratamentului în condiţiile menţionate [12].

CONCLUZII

1. Variantele de porumb HD 208 ale căror seminţe au fost tratate cu folcisteină Oeriu „P" se diferenţiază în sens pozitiv de varianta martor. La varianta tratată cu doza de 1/100 000 se observă modificări mai accentuate ; în frunzele acestor plante sînt crescute valorile vitaminelor PP şi C. Un alt fapt pozitiv îl reprezintă creşterea respiraţiei şi a transpiraţiei şi a raportului glutation redus/glutation oxidat (SH/SS).

2. Plantele tratate sînt mai viguroase şi au un sistem radicular mai dezvoltat şi mai ramificat. Observaţiile evidenţiază acţiunea grupărilor SH ale folcisteinei asupra creşterii şi dezvoltării porumbului de experienţă.

Prezentată la redacţie la 12 decembrie 1967

Institutul „Nicolae Bălcescu",
Catedra de fiziologie a plantelor şi microbiologie şi
Colectivul de chimioterapie
al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. Bastin M., *The mechanisme of Gibberellin action in lateral root initiation*, Wachstumsregulatoren bei Pflanzen, Symposium, Kühlungsborn, Oktober 1966.
2. Cartwrigt P. M., *The effect of growth regulating substances on the development on root nodules*, Wachstumsregulatoren bei Pflanzen, Symposium, Kühlungsborn, Oktober, 1966.
3. Chirilei A., Curticopeanu N., *Beiträge zur Bestimmung der Gibberilin säure und der Einfluss des Zusatzes dieser Säure auf morpho-physiologische Progresse bei der Zuckerrübe*, Wachstumsregulatoren bei Pflanzen, Symposium, Kühlungsborn, Oktober 1966.
4. Colowick S. P., Kaplan, J. L., *Methods in Enzymology*, sub red. Sidney P. Colowick şi Nathan O. Kaplan, Academic Press, New York—Londra, 1957—1962.
5. Davidescu D., Ionescu M., Ivănescu Magda, Pavlovschi Gh., Sluşanschi H., *Metode de analize chimice şi fizice folosite în agricultură*, Edit. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1963, p. 102—119.

6. Davidescu D., Oeriu S. și colab., *Grupările tiolice (SH), factor de creștere și dezvoltare a organismului vegetal și acțiunea lor asupra porumbului Tuxpeno*, Conferința națională de fiziologie a plantelor, octombrie 1967.
7. Guilleman P., *Les vitamines du groupe B*, Rev. Prat. **12**, 5, 519 (1962).
8. Hais J. M., Macek K., *Paper Chromatography*, Edit. tehnică, București, 1960, p. 525.
9. Knobloch R., *Physikalisch-chemische Vitaminbestimmungs-methoden*, Leipzig, 1963, p. 325.
10. Oeriu I., Oeriu S., *Sulphydryl (SH) groups as a growth stimulating factor in animals and in plants*, V-th Intern. Congr. of Chemotherapie, Vienna, 26 iunie—3 iulie, 1967.
11. Oeriu S., *Proteins in development and senescence*, sub red. B. L. Strehler, în *Advances in Gerontological Research*, Academic Press, New York, **1**, 1964, p. 23—85.
12. Oeriu S., *Date asupra mecanismului biochimic de stimulare a proceselor metabolice cu rol în creșterea și dezvoltarea plantelor*, St. cerc. biol. **18**, 6, 525—527 (1966).
13. Oeriu S., Cojocaru V., *The Dinamics of Heteroauxins in the Coleoptiles and Roots of Wheat Treated with Folcysteine Oeriu „P"*, Rev. Roum. Biochim. (1967).
14. Porolotskaya K. L., Sedenko D. M., *Metodă pentru determinarea simultană a acid-ascorbicoxidazei, polifenoloxidazei și a peroxidazei*, Biohimiia, **20**, 88 — 93 (1955).
15. Umbreith W. A., Buries Stanfel, *Tissue metabolism. Manometric Methods*, 1965, p. 59.
16. Woodford G. E., Fry E. S., J. biol. Chem. **37**, 465 (1932).

BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL MODIFICATIONS OF HD 208 MAIZE BY OERIU „P" FOLCYSTEINE ACTION

SUMMARY

The SH-groups enzymatically liberated by folcysteine determined an increase of the respiration, transpiration and of the values of the vitamins PP and C. The biochemical modifications are associated with a greater vigour of the treated plants and with a more accentuated development of the radicular system.

ST. CERC. BIOCHIM. 11, 2, 133 – 139 (1968)

CERCETAREA CATECOLAMINELOR ÎN LICHIDUL CEFALORAHIDIAN

AL. CIPLEA, GH. BUBUIANU şi N. DRĂGULESCU

Rezumat. – Utilizînd metoda Euler-Floding, modificată prin înlocuirea cu acid wolframic 10% a acidului tricloracetic folosit ca defecant, autorii au constatat că la om lichidul cefalorahidian conţine de peste 3 ori mai multe catecolamine decît sîngele, adrenalina reprezentînd în medie 23% din catecolaminele totale. În hipertensiunea arterială esenţială, proporţia de adrenalină creşte la 53–59% din catecolaminele totale. La ateroscleroşi, lichidul cefalorahidian conţine numai jumătate din procentul de adrenalină de la bolnavii cu hipertensiune arterială esenţială. Astfel, explorarea catecolaminelor poate servi la diagnosticul diferenţial al hipertensiunii arteriale esenţiale faţă de ateroscleroză.

Literatura medicală, foarte bogată în date asupra conţinutului în catecolamine al diverselor organe şi ţesuturi, inclusiv al sistemului nervos central şi periferic şi al unor splanhne, este mult mai modestă în ceea ce priveşte conţinutul în catecolamine al lichidului cefalorahidian (l.c.r.). L. Baliff şi colab. [1] arătaseră că l.c.r. al epilepticilor şi al bolnavilor cu inhibiţie catatonică produce pe inima izolată de broască efecte similare cu cele ale adrenalinei oxidate, iar Hoffer şi colab. [11] au găsit în sîngele schizofrenicilor mari cantităţi de adrenocrom. Hilton şi Schaim [10], recoltînd lichidul de perfuzie al ventriculelor la pisici anesteziate cu cloraloză sau cu pentobarbiton, găsesc acetilcolină dacă lichidul de perfuzie conţine ezerină, dar nu găsesc catecolamine sau hidroxitriptamină nici după administrarea de inhibitori ai monoaminooxidazei, urme de noradrenalină apărînd numai dacă adminsitrau şi DOPA, concomitent cu un inhibitor al monoaminooxidazei. Draškoci şi colab. [7] găsesc la unele animale de experienţă 10–40 μg de adrenalină pe ml de lichid cisternal.

Cercetarea catecolaminelor în l.c.r. are multiple motivări. Existenţa barierei hematoencefalice, imaginată şi dovedită de Lina Stern [17], precum şi reluarea acestei probleme de către numeroşi cercetători moderni pun de la sine şi problema comportării sale faţă de catecolamine în condiţii fiziologice şi patologice. Cum în literatura de specialitate consultată nu am găsit date referitoare la om, am pornit la aceste cercetări cu ideea că în boli ca hipertensiunea arterială esenţială, ateroscleroza şi glomerulonefritele cronice studiul catecolaminelor ar putea aduce noi elemente, utile pentru diagnosticul diferenţial. Primele rezultate ne-au dat un răspuns afirmativ la întrebarea dacă l.c.r. la om conţine catecolamine, aflîndu-le

în concentraţie de 4,5—5 μg la litru (în condiţiile tehnice de dozare utilizate de noi), adrenalina reprezentînd 22—23% din catecolaminele totale; în hipertensiunea arterială esenţială, procentul de adrenalină din l.c.r. îl urmează fidel pe cel din sînge, indicînd astfel existenţa unei funcţii reglatoare pentru catecolamine a elementelor barierei hematoencefalice.

MATERIAL ŞI METODE

Perfecţionate continuu, cu scopul evidenţierii şi cercetării separate a fiecăreia din catecolaminele simpaticomimetice, metodele de dozare sînt : *a*) biologică, *b*) biochimic-fotometrică (ambele de mult depăşite şi abandonate din cauza lipsei lor de specificitate sau a tehnicii extrem de laborioase) şi *c*) biochimic-fluorimetrice, utilizate azi [12]. Mersul tuturor metodelor de dozare fluorimetrice are în principiu trei timpi importanţi : 1) extracţia catecolaminelor din produsul biologic, 2) oxidarea lor şi 3) citirea rezultatelor.

În decursul timpului au fost propuse multiple tehnici de extracţie a catecolaminelor. Azi se folosesc două variante : a) extracţia cu acid tricloracetic şi 2) extracţia cu acid percloric. Odată extrase din produsul biologic, catecolaminele se purifică pe baza principiului reieşit din observaţia lui Shaw [16], care conchide asupra marii puteri absorbante a hidroxidului de aluminiu pentru catecolamine.

Variate metode de oxidare, sub forma unor compuşi fluorescenţi, pot fi reduse la două :

a) Metoda condensării cu etilendiamină. În prezenţa acesteia, catecolaminele dau naştere la produşi condensaţi de oxidaţie, fluorescenţi. Metode de acest gen sînt ale lui Weil-Malherbe şi Bone [18], [19], Natelson şi colab. [13] etc. Ele sînt foarte sensibile, avînd în acelaşi timp marea calitate că produşii fluorescenţi rezultaţi prezintă o mare stabilitate, dar sînt puţin specifice, deoarece în prezenţa etilendiaminei se produce şi condensarea altor catecolamine, în special a dopaminei, de unde cifrele ridicate obţinute cu această metodă : 5—7 μg noradrenalină, respectiv 2—3 μg adrenalină % plasmă.

b) Al doilea grup de metode pleacă de la principiul lui Lund şi Ehrlen, şi anume : oxidarea beta-catecolaminelor în adrenocrom (trihidroxiindol) şi trecerea lor în stare fluorescentă sub acţiunea unei baze puternice. Metoda trihidroxiindolilor este sensibilă şi are o specificitate cu mult mai mare decît metoda condensării cu etilendiamină, dar prezintă dezavantajul instabilităţii în timp a produşilor de oxidare rezultaţi. Pentru a împiedica continuarea oxidării şi a obţine o stabilizare de cîteva minute a produsului fluorescent, se adaugă un reductor, în speţă acidul ascorbic. Reacţia chimică a oxidării se poate face fie cu iod (metoda V.O. Osinskaia [14]), fie cu fericianură de potasiu (metoda von Euler-Floding [8]), fie cu oxid de mangan (metoda von Euler-Lishajko [9]). Alcalinizarea şi obţinerea produsului fluorescent (adreno- şi noradrenolutin) se fac cu hidroxid de sodiu.

„Citirea", adică diferenţierea precisă a celor doi compuşi, reprezentînd al treilea timp important al dozării, se realizează fie pe baza principiului oxidării inegale la pH diferit a adrenalinei şi a noradrenalinei (von Euler şi Floding [8]), fie pe baza principiului spectrelor de fluorescenţă diferite, demonstrate de lucrările lui Cohen şi Goldenberg [6], precum şi de Price şi Price [15], care au arătat că fluorescenţa maximă a adrenalinei şi a noradrenalinei nu apare la aceeaşi lungime de undă.

Am utilizat în cercetările noastre tehnica lui von Euler şi Floding [8], adaptată pentru prima dată la noi în ţară de Gr. Benetato şi colab. [2], [3]. Dimineaţa, pe nemîncate, înainte de scularea din pat şi în afară de orice tulburare a liniştii bolnavilor, se recoltează, în decubit dorsal, 35 ml sînge venos pe 35 ml soluţie de acid tricloracetic 10%, apoi se filtrează. Filtrarea nu trebuie să depăşească termenul de 2 ore de la recoltare. Filtratul se aduce la pH 8,4 cu hidroxid

de sodiu 4%, în prezența oxidului de aluminiu (1 g), apoi se agită și se filtrează din nou, prin filtru poros 15 AG 2, reținîndu-se oxidul de aluminiu, de pe care catecolaminele se eluează cu 7 ml acid acetic 0,3 M.

Diferențierea celor două catecolamine a fost realizată prin oxidarea probelor la pH-uri diferite (3,5 și, respectiv, 6). Tamponarea la pH 3,5 se obține cu un tampon format din 10,2 ml acid acetic M + 0,8 ml acetat de sodiu M, iar tamponarea la pH 6 cu tamponul format din 0,2 ml acid acetic M + 10,8 ml acetat de sodiu M. Pentru oxidare se iau cîte 2 ml din eluat + 1 ml din tamponul respectiv, adăugîndu-se fiecărei probe 0,1 ml fericianură de potasiu 0,25%, oxidarea durînd exact 2 min. Utilizarea fericianurii de potasiu, și nu a oxidului de mangan, explică diferențele valorice dintre rezultatele noastre și cele publicate de von Euler (9) după 1960. După cele 2 min de oxidare, se alcalinizează cu 1 ml hidroxid de sodiu 20%, iar blocarea oxidării se realizează adăugîndu-se 0,1 ml acid ascorbic 2%. Citirea rezultatelor s-a făcut în primele 5 min, la un spectrofotometru Jobin-Yvon, probele fiind excitate cu o rază luminoasă de 420 mμ lungime de undă. La ieșirea razei secundare a fost interpus un filtru portocaliu, pentru a „tăia" undele sub 500 mμ.

Cercetarea catecolaminelor în lichidul cefalorahidian s-a făcut din lichidul recoltat prin puncție suboccipitală, în poziție șezîndă. Cercetări de control preliminare ne-au arătat că valorile catecolaminelor din l.c.r. nu variau în funcție de poziția subiectului. Defecarea celor 10 ml de l.c.r. nu s-a efectuat cu soluția de acid tricloracetic, conform metodei originale a lui von Euler-Floding, ci, avînd în vedere bogăția în aminoacizi a l.c.r., cu 10 ml soluție de acid wolframic 10%.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În prima serie de cercetări, am căutat catecolaminele din l.c.r. și din sînge la bolnavi cu hipertensiune arterială esențială, precum și la un lot de martori [4]. Am stabilit, în primul rînd, că l.c.r. la om conține catecolamine, cantitatea lor globală fiind mai mare decît cea din sînge, și anume de 5,4 ori la bărbați și de 3,8 ori la femei în lotul martor; de 4,4 ori și, respectiv, 4,7 ori la lotul de hipertensivi.

Tabela 1

Valorile catecolaminelor din sînge și din l.c.r. (în μg %) la bărbați cu HAE

Nr. crt.	Cazul	Vîrsta (ani)	Sînge				l.c.r.			
			catecolamine totale	noradrenalină	adrenalină	%adrenalină	catecolamine totale	noradrenalină	adrenalină	%adrenalină
1	*D. V.*	23	0,65	0,42	0,23	35	1,13	0,61	0,52	45
2	*G. S.*	35	0,71	0,21	0,50	70	3,76	nedoz.	3,76	—
3	*B. P.*	35	0,68	nedoz.	0,68	—	3,19	0,33	2,86	88
4	*F. A.*	44	0,96	0,42	0,54	56	2,83	1,26	1,57	55
5	*T. P.*	47	1,62	0,58	1,04	64	9,44	5,26	4,18	44
6	*T. V.*	47	0,84	0,63	0,21	26	4,54	1,83	2,71	60
7	*C. G.*	51	0,21	nedoz.	0,21	—	2,52	nedoz.	2,52	—
8	*R. A.*	57	1,45	0,91	0,54	37	3,03	1,89	1,14	37
9	*L. T.*	61	0,85	0,45	0,40	47	2,52	0,95	1,57	62
10	*Z. I.*	73	1,16	0,87	0,29	25	6,66	4,20	2,46	35
Valori aritmetice medii			0,91	0,56	0,46	45	3,96	2,04	2,32	53

Tabela 2

Valorile catecolaminelor din sînge și din l.c.r. (în μg °/₀₀) la bărbați martori

Nr. crt.	Cazul	Vîrsta (ani)	Sînge				l.c.r.			
			catecolamine totale	noradrenalină	adrenalină	%adrenalină	catecolamine totale	noradrenalină	adrenalină	% adrenalină
1	*D. T.*	26	0,97	0,63	0,34	34	5,35	4,06	1,29	25
2	*P. W.*	28	0,13	nedoz.	0,13	—	5,40	4,13	1,27	24
3	*C. S.*	35	0,54	0,10	0,44	81	1,02	1,02	nedoz.	—
4	*D. E.*	47	1,57	1,47	0,10	7	3,58	2,66	0,92	22
5	*C. I.*	47	0,56	0,19	0,37	65	4,45	2,77	1,68	36
6	*P. G.*	54	0,78	0,52	0,26	33	3,57	3,03	0,54	16
7	*G. I.*	67	0,68	0,52	0,16	24	5,05	3,79	1,26	22
8	*O. O.*	70	1,52	1,16	0,36	24	8,40	7,36	1,04	12
Valori aritmetice medii			0,84	0,65	0,27	38	4,60	3,60	1,14	22

Tabela 3

Valorile catecolaminelor din sînge și din l.c.r. (în μg °/₀₀) la femei cu HAE

Nr. crt.	Cazul	Vîrsta (ani)	Sînge				l.c.r.			
			catecolamine totale	noradrenalină	adrenalină	% adrenalină	catecolamine totale	noradrenalină	adrenalină	% adrenalină
1	*S. M.*	51	3,42	2,03	1,39	40	9,74	4,85	4,91	50
2	*M. A.*	52	1,94	0,98	0,96	50	7,84	3,14	4,70	58
3	*D. V.*	52	0,43	0,29	0,14	32	10,44	4,20	6,24	59
4	*N. N.*	56	0,74	0,18	0,56	75	5,65	1,24	4,41	78
5	*P. A.*	57	2,32	1,74	0,58	26	12,52	4,20	8,32	66
6	*R. F.*	57	2,03	1,45	0,58	28	14,70	10,52	4,18	35
7	*B. A.*	58	1,80	0,96	0,84	40	1,38	0,30	1,08	85
8	*P. P.*	58	0,92	0,36	0,56	60	1,57	0,63	0,94	60
9	*C. E.*	59	1,35	0,58	0,77	57	10,42	2,10	8,32	70
10	*P. A.*	63	0,97	0,42	0,55	56	2,84	1,18	1,66	57
11	*P. I.*	64	2,32	1,16	1,16	50	6,93	5,26	1,67	24
12	*V. E.*	64	0,58	0,29	0,29	50	7,54	4,40	3,14	41
13	*M. A.*	73	0,27	0,17	0,10	33	2,20	0,63	1,57	71
14	*H. H.*	73	3,49	1,74	1,74	50	13,61	2,10	11,50	81
Valori aritmetice medii			1,61	0,88	0,73	46	7,67	3,19	4,47	59

Cît privește fracțiunile catecolaminice, se găsesc atît adrenalina, cît și noradrenalina. La lotul de hipertensivi, noradrenalina în l.c.r. *față* de sînge este numai de 3,6 ori mai mare comparativ cu de 5,5 ori la martori, iar adrenalina de 5,4 ori mai mare la hipertensivi față de 4,2 ori la martori. La femei, situația este similară : noradrenalina este la hipertensive de 3,5 ori mai mare față de 4,5 ori la martore, iar adrenalina de 6 ori mai mare la hipertensive față de 2 ori la martore.

O analiză superficială a valorilor aflate ar putea duce la concluzia că bariera hematoencefalică are un comportament aproape identic la normali și la hipertensivi, că și într-un caz și în celălalt diferența este numai cantitativă. Analizînd însă procentul de adrenalină în cifre medii și date solitare,

Tabela 4

Valorile catecolaminelor din sînge și din l.c.r. (în μg °/₀₀) la femei martore

Nr. crt.	Cazul	Vîrsta (ani)	Sînge				l.c.r.			
			catecolamine totale	noradrenalină	adrenalină	% adrenalină	catecolamine totale	noradrenalină	adrenalină	% adrenalină
1	*P. A.*	30	0,52	0,10	0,42	80	1,84	1,23	0,61	33
2	*N. M.*	32	0,63	nedoz.	0,63	—	1,38	1,23	0,15	11
3	*S. G.*	36	2,32	0,87	1,45	62	9,97	7,36	2,61	26
4	*B. I.*	58	2,47	1,46	1,00	40	8,93	7,36	1,56	17
5	*P. E.*	64	0,73	0,63	0,10	14	5,68	3,73	1,90	33
6	*B. A.*	65	1,43	1,30	0,13	9	3,03	2,36	0,67	19
Valori aritmetice medii			1,35	0,87	0,62	41	5,14	3,88	1,25	23

concluzia diferenței nete de comportament se impune. Pe cînd la hipertensivi adrenalina reprezintă în sînge 54% la bărbați și 46% la femei, iar în l.c.r. 53 și, respectiv, 59%, la lotul martor ea nu reprezintă decît 22% la bărbați și 23% la femei în l.c.r. față de 38% la bărbați, respectiv 41% la femei în sînge. Aceste valori anormale ale procentului de adrenalină în sînge la lotul martor sînt determinate de prezența unor subiecți patologici din punct de vedere clinic, însă fără hipertensiune arterială esențială, deci cu atît mai utili pentru interpretarea datelor noastre. Pregnanța maximă este oferită de analiza datelor solitare. Fiecare caz în parte al lotului de bolnavi arată o creștere sau cel puțin o egalitate a procentului de adrenalină în l.c.r. față de sînge. La lotul martor, l.c.r. nu mai „ascultă" de sînge, procentul de adrenalină oscilează puțin în jurul cifrei medii de 23, iar la subiecții ce prezintă în sînge procente anormale (în afara existenței hipertensiunii arteriale esențiale) acestea nu se repercutează asupra valorilor calitative din l.c.r., aici păstrîndu-se cu fidelitate homeostazia aminelor presoare. Bariera hematoencefalică nu joacă rolul unui simplu filtru. Ea apare ca element de reglare selectivă. Deci, în prezența unei hipertensiuni arteriale esențiale, catecolaminele totale ale l.c.r. pot să scadă sau să crească, însă procentul de adrenalină urmează fidel pe cel al sîngelui, ceea ce pune problema unei funcții reglatorii pentru catecolamine a diferitelor structuri ale barierei hematoencefalice.

Rezultatele noastre pun în discuție o serie de probleme. Una din ele este proveniența catecolaminelor existente în l.c.r. Se poate admite pentru normali, în baza cunoștințelor clasice, că sursa lor este sanguină, probabil și cerebrală. În caz patologic, participarea indirectă cerebrală ar putea fi mai importantă, ținînd cont de documentele faptice care arată aviditatea hipotalamusului pentru adrenalină și existența hipoexcitabilității organovegetative. Se pune apoi întrebarea dacă l.c.r. constituie un simplu emonctor sau o vastă „granulă" lichidă de înmagazinare a catecolaminelor, precum și întrebarea dacă pragul crescut al adrenalinorahiei nu ar putea avea răsunet asupra activității cortico-subcorticale, asupra vaselor cerebrale și asupra tunicilor lor de protecție.

Într-o a doua serie de cercetări [5] am căutat să vedem comportarea catecolaminelor l.c.r. și sanguine în ateroscleroză comparativ cu hipertensiunea arterială esențială. Am constatat că, pe cîtă vreme catecola-

minele totale se găsesc în cele două loturi la valori sensibil egale, există o netă diferenţă în comportarea fracţiunilor catecolaminelor: atît în l.c.r., cît şi în sînge adrenalina este la ateroscleroşi numai jumătate din valoarea de la hipertensiunea arterială esenţială. Comparativ cu valoarea de 23% considerată ca normală pentru adrenalina din catecolaminele totale, procentul de adrenalină este mai mare numai de 1,26 ori în l.c.r. şi de 1,27 ori în sînge la ateroscleroşi faţă de normali; la hipertensiunea esenţială este în l.c.r. de 2,86 ori şi în sînge de 2,74 ori mai mare decît la normali.

Tabela 5

Comportarea fracţiunii adrenalinice din catecolaminele totale la normali, la ateroscleroşi şi în hipertensiunea arterială esenţială

$$\text{Normal}: \frac{\text{adrenalină}}{\text{catecolamine totale}} = \frac{23}{100}$$

	Ateroscleroză (AT)	Hipertensiune arterială esenţială (HAE)
L.c.r.	$\frac{\%\text{ adrenalinei la AT}}{\%\text{ adrenalinei la normal}} = 1{,}26$	$\frac{\%\text{ adrenalinei la HAE}}{\%\text{ adrenalinei la normal}} = 2{,}86$
Sînge	$\frac{\%\text{ adrenalinei la AT}}{\%\text{ adrenalinei la normal}} = 1{,}27$	$\frac{\%\text{ adrenalinei la HAE}}{\%\text{ adrenalinei la normal}} = 2{,}74$

Rezultatele obţinute de noi în această a doua parte a cercetărilor noastre ne arată că explorarea catecolaminelor în l.c.r. şi în sînge constituie un nou mijloc de diagnostic diferenţial între ateroscleroza cu sau fără hipertensiune secundară şi hipertensiunea arterială esenţială.

CONCLUZII

Cercetarea catecolaminelor lichidului cefalorahidian se poate face utilizînd metoda lui von Euler-Floding [8], modificată de noi în sensul utilizării pentru defecarea lichidului a unei soluţii 10% de acid wolframic în locul acidului tricloracetic, avînd în vedere bogăţia în aminoacizi a acestuia.

Lichidul cefalorahidian la om conţine de peste 3 ori mai multe catecolamine decît sîngele, adrenalina reprezentînd în medie 23% din catecolaminele totale.

În hipertensiunea arterială esenţială, proporţia adrenalinei în catecolaminele totale creşte la 53—59%.

La ateroscleroşi lichidul cefalorahidian conţine numai jumătate din procentul de adrenalină din hipertensiunea arterială esenţială. Astfel, explorarea catecolaminelor poate servi la diagnosticul diferenţial al hipertensiunii arteriale esenţiale faţă de ateroscleroză.

Prezentată la redacţie la 8 octombrie 1966

Institutul de fiziologie normală şi patologică „D. Danielopolu" al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. Baliff L., Jitaru P., Brînzei P., *Contribuțiuni la studiul fiziopatologiei lichidului cefalorahidian uman*, St. cerc. șt. med. (Iași) **3**, 481 (1951).
2. Benetato Gr., Vasilescu V., Miulescu Viorica, Grosu L., Ștefănescu Elisabeta, Bubuianu Elisabeta, *Étude de certains facteurs humoraux de l'activité des centres encéphaliques grâce à la méthode de la perfusion artificielle de la tête et du cerveau isolés*, J. Physiol. (Paris) **50**, 889 (1958).
3. Benetato Gr., Tomuș L., Bubuianu Elisabeta, Uluitu M., *Cercetări privind mecanismele de funcționare și semnificația fiziologică a sistemului de transmitere chimică la nivelul centrilor organovegetativi superiori*, St. cerc. fiziol. **4**, 449 (1959).
4. Ciplea Al., Bubuianu Gh., Gălășanu Elena, *Study on cerebrospinal fluid catecholamines in hypertensive disease*, Intern. J. Neuropharmacol. **3**, 583 (1964).
5. Ciplea Al., Bubuianu Gh., Bubuianu Elisabeta, Gălășanu Elena, *Cerebrospinal fluid catecholamines and blood catecholamines in atherosclerosis*, în *National Conference of Physiology, Summaries of Papers, Bucarest*, 1964, p. 132.
6. Cohen I., Goldenberg I. (citați de Jeanne Fugazza), *Contribution à l'étude de la noradrenaline cérébrale*, J. Physiol. (Paris) **55**, Suppl. VIII (1963).
7. Draškoci T., Feldberg W., Haranath P., *Passage of circulating adrenaline in the perfused cerebral ventricles and subarachnoidal space*, J. Physiol. (Lond.), **150**, 34 (1960).
8. Euler U. S. von, Floding A. J., *Fluorimetric estimation of noradrenaline and adrenaline in urine*, Acta physiol. scand. **33**, Suppl. 118, 45 (1955).
9. Euler U. S. von, Lishajko S., *Uptake of catecholamines by adrenergic nerve granules*, Acta physiol. scand. **53**, 196, (1961).
10. Hilton S. M., Schaim R. J., *A search for pharmacologically active substance in fluid from the cerebral ventricles*, J. Physiol. (Lond.) **157**, 46 (1961).
11. Hoffer A. et al. (citați de Haulică I.), *Actualități în domeniul transmiterii neuroumorale centrale*, Fiziol. norm. patol. **7**, 289 (1961).
12. Jones R. T., Blake W. D., *Fluorimetric estimation of epinephrine andnorepi nephrine*, J. appl. Physiol. **12**, 448 (1958).
13. Natelson S., Lugovoy J. K., Pincus J. B. (citați de Jones R. T., Blake W. D.), *Fluorimetric estimation of epinephrine and norepinephrine*, J. appl. Physiol. **12**, 448, (1958).
14. Osinskaia V. O., *Issledovanie obmeno adrenalina i noradrenalina v tcaniah jivotnogo organizma*, Biohimiia **22**, 537 (1957).
15. Price H. L., Price Mary L., *The chemical estimation of epinephrine and norepinephrine in human and canine plasma*, J. Lab. clin. Med. **50**, 769 (1957).
16. Shav F. H., *The estimation of adrenaline*, Biochem. J. **32**, 19 (1938).
17. Stern Lina, *Stadiul actual al problemei barierei hematoencefalice*, Anal. rom—sov., Med. gen. **5**, 36 (1958).
18. Weil-Malherbe H., Bone A. D., *The chemical estimation of adrenaline-like substances in blood*, Biochem. J. **51**, 311 (1952).
19. Weil-Malherbe H., Bone A. D., *The effect of reserpine on the intracellular distribution of catecholamines in the brain stem of the rabbit*, Neurochemistry **4**, 251 (1959).

CATHECHOLAMINE INVESTIGATION IN THE CEREBROSPINAL FLUID

SUMMARY

Employing the Euler-Floding method modified by substitution of trichloroacetic acid used as defecant with 10% wolframic acid, the authors found that in Man, the cerebrospinal fluid contains more than three fold quantity of blood cathecholamine, the adrenaline representing an average of 23 per cent of the total cathecholamines. În the essential arterial hypertension the adrenaline increases to 53—59% of the total cathecholamines. In atherosclerosis the cerebrospinal fluid contains only half of the cerebrospinal adrenaline percentage of the patients with essential arterial hypertension. Thus, the cathecholamine exploration can be useful for the differential diagnostic between essential arterial hypertension and atherosclerosis.

ST. CERC. BIOCHIM. II, 2, 141–151(1968)

HIDROLIZA TRIPTICĂ A IgG DE IEPURE FLUORESCENTĂ DENATURATĂ PRIN CĂLDURĂ

CORINA DRAGOMIRESCU

Rezumat. — Hidrolizatul triptic de IgG fluorescentă, denaturată prin căldură, a fost analizat prin gel-filtrare succesivă pe Sephadex G—10, G—25 și G—50, asociată cu cromatografia pe hîrtie a piscurilor separate prin gel-filtrare.

S-au pus în evidență cel puțin 15 peptide, dintre care 38% cu greutate moleculară pînă la 700, 52% cu greutate moleculară pînă la 5000 și 10% cu greutate moleculară peste 5000.

Analizate cromatografic, peptidele au putut fi separate la rîndul lor în 34 de spoturi ninhidrin-pozitive și 3 spoturi fluorescente. Deoarece cromatografia pe hîrtie a aminoacizilor semnalează prezența alaninei fluorescente, s-a tras concluzia că cele 3 spoturi fluorescente provin din porțiunea N-terminală a lanțului L, care conține ca aminoacid N-terminal alanina.

Cercetări anterioare efectuate în laboratorul nostru [1], [2], [3], [4] au arătat că prin fluorocromare, în condiții determinate de temperatură și pH, o moleculă de IgG fixează două molecule de DANSIL (clorura acidului 1-dimetilaminonaftalen-5-sulfonic) distribuite în mod inegal în cele două lanțuri. Astfel lanțul H reține cu 30% mai mult fluorocrom decît lanțul L [3], iar fixarea are loc în porțiunea N-terminală (Fd) a lanțului H, implicată în formarea zonei de combinare a anticorpilor [4].

Lucrarea de față își propune studierea distribuției fluorocromului la nivelul unor subunități mai mici, cum sînt peptidele (prin scindarea triptică a IgG, după denaturarea prin căldură) sau aminoacizii (prin hidroliza acidă).

La alegerea DANSIL-ului ca agent de fluorocromare s-a ținut seama de folosirea sa ca reactiv specific pentru determinarea grupărilor N-terminale ale proteinelor și peptidelor [5], [6] și de stabilitatea DANSIL-derivaților și DANSIL-aminoacizilor.

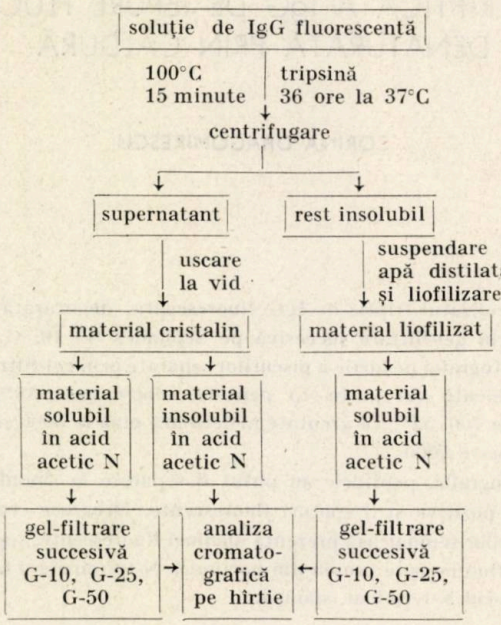
MATERIAL ȘI METODE

S-a lucrat după schema din pagina următoare.

Izolarea și purificarea IgG de iepure s-a efectuat conform metodei indicate în [3].

Fluorocromarea IgG purificate s-a făcut conform metodei lui Rinderknecht [7], cu clorura acidului 1-dimetilaminonaftalen-5-sulfonic (clorura de DANSIL), pe celită, în tampon tris

0,5 M, pH 8,0. Excesul de fluorocrom s-a îndepărtat prin filtrare pe o coloană de Sephadex G—50, cu NaCl 0,85 %, după cum s-a arătat într-o lucrare anterioară [3].



Tripsinoliza (după denaturare) și prelucrarea hidrolizatului pînă la stadiul de gel-filtrare. 100 mg IgG de iepure, purificată și fluorocromată, s-au suspendat în 5 ml apă distilată și s-au introdus pe timp de 15 minute într-o baie de apă la fierbere. După răcire s-a adăugat $(NH_4)_2CO_3$, pînă cînd concentrația în carbonat a devenit 0,1 M și pH 8,0 [8]. Peste soluția care conține proteina s-au adăugat, în două reprize (la 20 de ore interval), cîte 0,5 ml dintr-o soluție ce conținea 5 mg tripsină (Serva) de două ori cristalizată, liofilizată. Ca antiseptic, pe suprafața soluției s-au picurat 1—2 picături de toluen, după care eprubeta, bine astupată, s-a ținut la termostat, 36 de ore, la 37°C. După terminarea tripsinolizei, hidrolizatul s-a introdus într-un exicator de vid ce conținea H_2SO_4 și NaOH solid. S-a tras la vid pînă ce soluția a ajuns la sec și carbonatul a sublimat [8]. Reziduul obținut a fost prelucrat ca mai jos.

Gel-filtrare succesivă peste Sephadex G—10, G—25 și G—50. Reziduul cristalin s-a reluat în acid acetic N și s-a centrifugat, iar 2 ml din supernatantul puternic fluorescent s-au introdus într-o coloană de Sephadex G—10 (40,5 × 1,7 cm). Prima fracțiune eluată cu volumul spațiului gol s-a concentrat prin evaporare pînă la 2,5 ml și s-a introdus într-o coloană de Sephadex G—25 (30 × 1,7 cm). Ca și în cazul anterior, piscul care s-a exclus în volumul spațiului gol s-a concentrat prin evaporare pînă la 2 ml și s-a introdus într-o coloană de Sephadex G—50.

Determinarea volumului spațiului gol s-a făcut cu blue dextran (Pharmacia).

În toate cazurile, eluția s-a efectuat în acid acetic N, care a dat o separare mai eficientă decît mediul alcalin ($(NH_4)_2CO_3$ 0,1 M, pH 8,0). Volumul fracțiunilor colectate a fost de 2 ml. Viteza de curgere 40 ml/oră.

Eluatele obținute au fost analizate sub 3 aspecte:

— Densitatea optică la 280 mμ a fost determinată spectrofotometric.

— Reacţia cu ninhidrină s-a efectuat conform metodei lui Moore şi Stein [9]. Peste proba de 2 ml s-au adăugat 0,5 ml din reactivul cu ninhidrină (0,075 g hidrinden dizolvate în 18,75 ml metilcellosolve, peste care s-au adăugat 6,25 ml tampon acetat 4N, pH 5,5) şi s-a ţinut totul 15 minute la fierbere ; după răcire, dacă soluţia a fost prea concentrată, s-a diluat cu 5 ml alcool etilic 50%. Fotometrare la 570 mμ.

— Intensitatea fluorescenţei s-a măsurat la ultramicrofluorometrul Shimadzu Kataki.

Cromatografia pe hîrtie şi ionoforeza. Piscurile obţinute în urma fracţionării succesive prin gel-filtrare s-au evaporat la sec, iar reziduurile s-au reluat în 0,3 ml izopropanol 10%. S-au aplicat spoturi variind între 0,01 şi 0,03 ml, în funcţie de concentraţia polipeptidului. S-a folosit hîrtie de filtru Whatman nr. 2 şi eluanţii : butanol-apă-acid acetic (110 : 110 : 30 v/v) [10] şi eter de petrol-acid acetic-apă (100 : 90 : 10 v/v) [11]. Irigare descendentă, durata 36, respectiv 48 de ore. Localizarea şi evidenţierea spoturilor s-a făcut cu o soluţie cu ninhidrină 0,3% în etanol, la temperatura camerei şi întuneric.

DANSIL-alanina s-a preparat după metoda lui Deyl şi Rosmus [6].

Ionoforeza s-a efectuat conform indicaţiilor date de Gray şi Hartley [5], în tampon acid acetic 0,8%, piridină 0,4%, pe hîrtie Whatman nr. 3MM, la pH 4,4 şi la un potenţial de 980—1000 V, o intensitate de 20—23 mA şi durata de 1 oră.

Hîrtiile s-au prelucrat la fel ca pentru cromatografia pe hîrtie.

Hidroliza cu HCl 6 N. Trei porţiuni de cîte 5 mg IgG de iepure fluorocromată s-au dizolvat în 0,5 ml HCl 6N. Fiolele închise s-au introdus într-o baie de apă la fierbere unde una a fost lăsată timp de 15 minute, iar celelalte cîte 1 oră, respectiv 24 de ore. După terminarea hidrolizei, conţinutul fiolei s-a evaporat la sec, reziduul s-a reluat de două ori cu apă distilată şi apoi în izopropanol 10%. Cromatografia pe hîrtie s-a făcut în condiţiile arătate mai sus.

Ca probe martor au servit IgG nefluorocromată şi clorura de DANSIL (0,1 ml clorură de DANSIL în acetonă + 0,5 ml HCl 6N), trecute prin aceleaşi etape.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Analiza supernatantului

Rezultatele obţinute prin trecerea succesivă a supernatantului hidrolizatului triptic peste cele trei tipuri de Sephadex (G—10, G—25, G—50) sînt arătate în figura 1.

Gel-filtrarea peste o coloană de Sephadex G—10 separă minimum 5 fracţiuni (fig. 1 *a*), dintre care una — ce reprezintă 62% şi se exclude din gel — cuprinde peptide cu o greutate moleculară mai mare de 700. Celelalte fracţiuni (B, C, D) sînt alcătuite din peptide cu greutate moleculară pînă la 700, ceea ce denotă că ele ar putea conţine 2—6 aminoacizi. În plus, piscurile prezintă asimetrie, ceea ce pare să arate că ele ar fi constituite din amestecuri de peptide cu greutate moleculară apropiată. Analiza prin cromatografie pe hîrtie a eluatelor cuprinse în piscul C ninhidrin-pozitiv (fig. 1 *a*) confirmă aceste presupuneri. Se separă 10 spoturi colorabile cu ninhidrină şi 3 spoturi fluorescente care nu se colorează cu ninhidrina (fig. 2). Fluorescenţa acestor spoturi şi absenţa colorării cu ninhidrină arată că unele spoturi fluorescente s-ar datora fie DANSIL-ului eliberat în urma hidrolizei (cu R_F mai ridicat), fie produşilor săi de degradare, şi nu DANSIL-ului legat de peptide, deoarece se ştie că numai peptidele care au gruparea aminică liberă se colorează cu ninhidrină. În cazul DANSIL-aminoacizilor, comportarea faţă de reacţia cu ninhidrină depinde de gruparea —NH—, care determină ca reacţia să fie slabă sau să prezinte un aspect diferit, după cum arată şi Kasuya şi Takasina [12]. R_F-ul clorurii de DANSIL corespunzînd

spotului fluorescent cu R_F-ul cel mai mare, numai două din spoturile fluorescente pot fi considerate ca reprezentînd peptide marcate.

Deci, pe Sephadex G—10 se separă prin gel-filtrare 4 piscuri alcătuite din peptide cu greutăţi moleculare net diferite. Unul dintre

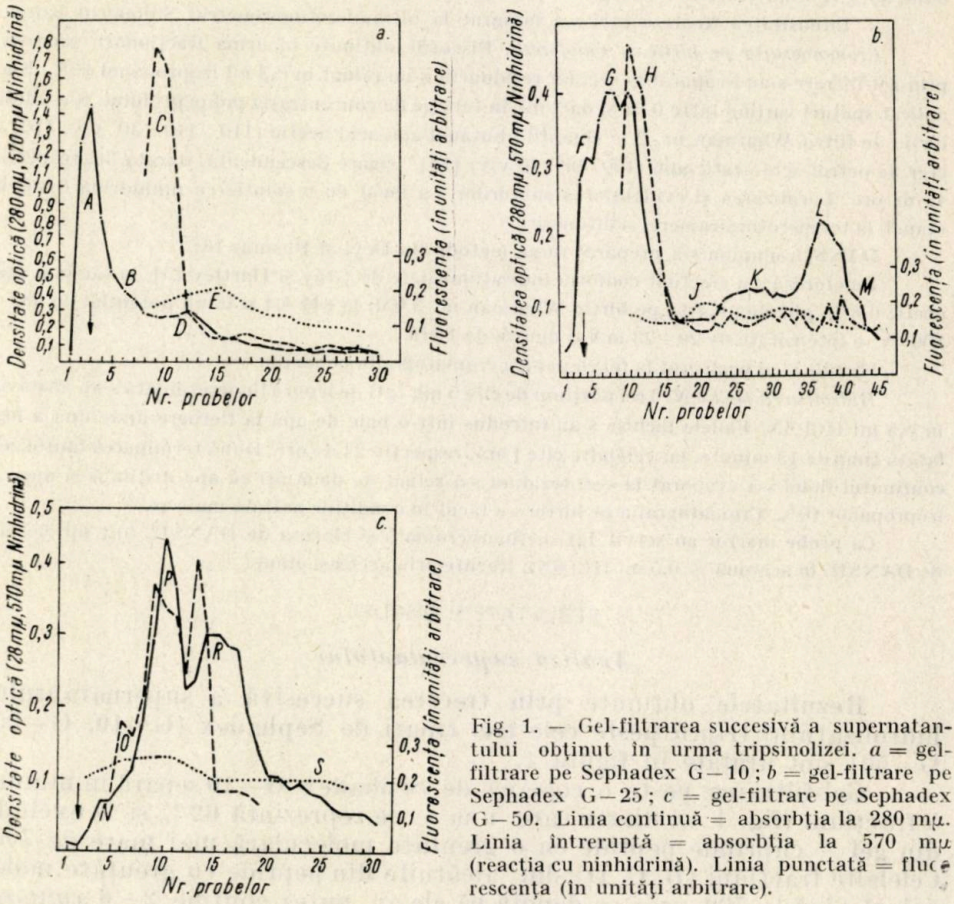


Fig. 1. — Gel-filtrarea succesivă a supernatantului obţinut în urma tripsinolizei. *a* = gel-filtrare pe Sephadex G—10 ; *b* = gel-filtrare pe Sephadex G—25 ; *c* = gel-filtrare pe Sephadex G—50. Linia continuă = absorbţia la 280 mμ. Linia întreruptă = absorbţia la 570 mμ (reacţia cu ninhidrină). Linia punctată = fluorescenţa (în unităţi arbitrare).

ele (C) este eterogen, fiind alcătuit din 10 spoturi ninhidrin-pozitive şi din 3 spoturi fluorescente care nu se colorează cu ninhidrina, dintre care unul este dat de DANSIL-ul liber (fig. 2).

Prin trecerea peste o coloană de Sephadex G—25 a eluatului care se exclude din gelul de Sephadex G—10, se observă că se pot obţine cel puţin 7 piscuri (fig. 1 *b*), dintre care cel care cuprinde peptide ce se exclud (greutate moleculară mai mare de 5000) nu reprezintă decît 17% (piscul F). Aceasta înseamnă că 83% din peptidele obţinute au greutatea moleculară cuprinsă între 1000 şi 5000. După volumul necesar eluţiei lor, rezultă că există 3 grupe de peptide : prima, cu o greutate moleculară apropiată de 5000, este alcătuită din piscurile G, H şi I ; a doua grupă (K) are o greutate moleculară intermediară şi, în sfîrşit, grupa a treia (L, M) are un volum de eluţie asemănător cu acela al

peptidelor cu greutate moleculară de 1000. În plus, aici pot interveni și fenomene de adsorbție care fac ca peptidele să nu părăsească coloana corespunzător greutății lor moleculare. Acest fenomen a fost semnalat de diferiți autori [13], [14] în cazul compușilor aromatici și eterociclici.

Se constată apoi nesuprapunerea maximelor de fluorescență cu cele de la 280 mμ și ninhidrină. Acest lucru pare să indice că există

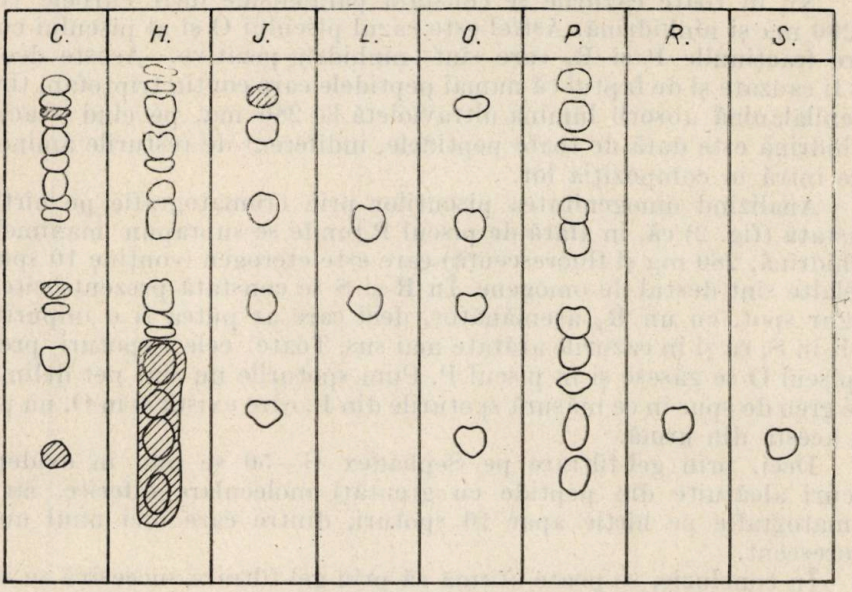


Fig. 2. — Cromatografia pe hîrtie a fracțiunilor obținute prin gel-filtrarea succesivă a supernatantului. Zonele haşurate indică fluorescența.

cantități mici de peptide între piscuri (cum ar fi piscul J și cel între K și L), care pot fixa fluorocromul în molecula intactă.

Pentru a studia omogenitatea piscurilor separate, s-au analizat eluatele cuprinse sub piscurile H, J (puternic ninhidrin-pozitive, cu maximum de fluorescență ninhidrin-negativă) și L. Din figura 2 se constată că piscul H cuprinde 14 spoturi colorabile cu ninhidrină, dintre care ultimele 4 cu R_F mare se etalează într-o zonă puternic fluorescentă. Piscul J se separă în 5 spoturi nete, dintre care unul este fluorescent, asemănător cu spotul fluorescent din piscul C. În sfîrșit, în zona L se găsesc două spoturi ninhidrin-pozitive și nici unul fluorescent. R_F-ul unor spoturi din piscurile H, J și L este identic. Astfel, cele două spoturi din piscul L se găsesc și în celelalte două piscuri. De asemenea, spotul cu R_F intermediar din fracțiunea J se găsește și în fracțiunea H. Aceste spoturi comune ar putea rezulta din insuficienta delimitare a piscurilor cromatografice și deci din existența unor impurificări reciproce în piscuri.

Deci, pe Sephadex G—25 se separă prin gel-filtrare 6 piscuri alcătuite din peptide cu greutăți moleculare diferite. Cromatografia pe hîrtie evidențiază cel puțin 14 spoturi, dintre care unul net fluorescent (fig. 2).

Analizarea în continuare a supernatantului hidrolizatului triptic pe Sephadex G—50 pune în evidență faptul că nu se mai eluează nimic cu

volumul spațiului gol (fig. 1 *c*), ceea ce arată că în acest supernatant nu există peptide cu greutate moleculară mai mare de 30 000. Acest lucru pare normal dacă se ține seama că s-a îndepărtat partea insolubilă, rezistentă la tripsinoliză, precum și partea care nu se solvă în acid acetic N. Din această separare se etalează peptide cu greutate moleculară cuprinsă între 5000 și 30 000, care se evidențiază în minimum 5 fracțiuni.

Nu în toate cazurile se constată paralelisme între curbele trasate la 280 mμ și ninhidrină. Astfel este cazul piscului O și al piscului cuprins între fracțiunile P și R, care sînt ninhidrin-pozitive. Aceste deosebiri pot fi cauzate și de faptul că numai peptidele care conțin triptofan, tirozină și fenilalanină absorb lumina ultravioletă la 280 mμ, pe cînd reacția cu ninhidrină este dată de toate peptidele, indiferent de resturile aminoacide care intră în compoziția lor.

Analizînd omogenitatea piscurilor prin cromatografie pe hîrtie, se constată (fig. 2) că, în afară de piscul P (unde se suprapun maximele de ninhidrină, 280 mμ și fluorescență) care este eterogen (conține 10 spoturi), celelalte sînt destul de omogene. În R și S se constată prezența cîte unui singur spot, cu un R_F asemănător, deci care ar putea fi o impurificare de R în S, ca și în cazurile arătate mai sus. Toate cele 4 spoturi prezente în piscul O se găsesc și în piscul P. Cum spoturile nu sînt net delimitate, este greu de spus în ce măsură spoturile din P, care există și în O, nu provin din acesta din urmă.

Deci, prin gel-filtrare pe Sephadex G—50 se pun în evidență 5 piscuri alcătuite din peptide cu greutăți moleculare diferite, iar prin cromatografie pe hîrtie apar 10 spoturi, dintre care nici unul nu este fluorescent.

În concluzie, se poate afirma că prin gel-filtrare succesivă se separă cel puțin 15 piscuri în care sînt incluse peptide cu o greutate moleculară net diferită. Aceste peptide nu sînt decît în puține cazuri omogene (piscurile R, S), cromatografia pe hîrtie putînd separa un număr mare de componente. Analizîndu-se cromatografic 8 din cele 15 piscuri, s-a determinat că ele se separă în 34 de spoturi ninhidrin-pozitive, nefluorescente, și în 3 spoturi fluorescente.

Analiza materialului insolubil

În materialul care rămîne insolubil după tripsinoliză se găsesc peptide și proteine cu greutate moleculară foarte variată. Astfel, prin gel-filtrarea pe Sephadex G—10 se observă existența a trei fracțiuni (fig. 3 *a*). Prima se exclude din gel, iar analiza celorlalte două arată că una din ele este puternic fluorescentă și eterogenă, alcătuită din 8 spoturi, dintre care unul fluorescent (fig. 4 *c*).

Din analiza fracțiunii care se exclude prin gel-filtrare pe Sephadex G—10 rezultă că 42% din materialul studiat este reținut pe coloana de Sephadex G—25 (fig. 3 *b*). Preparatul analizat este alcătuit din 3 peptide cu greutatea moleculară cuprinsă între 1000 și 5000. Cel mai eterogen s-a dovedit piscul H′ (fig. 4), ninhidrin-pozitiv și alcătuit din 8 spoturi, dintre care unul fluorescent.

Ca și în cazul analizei supernatantului, se observă și aici neconcordanțe flagrante între maximele obținute prin absorbția la 280 mμ și ninhidrină (fig. 3 *a* și *b*).

În cazul gel-filtrării pe Sephadex G—50 se constată că, spre deosebire de supernatant, există o fracțiune (38%) care se exclude din gel, deci are o greutate mai mare de 30 000 (fig. 3 *c*). Natura acestui fragment a fost analizată și va face obiectul unei alte lucrări. Aspectul celor 3 peptide care se separă prin gel-filtrare este, în general, mai omogen, cromatografia pe hîrtie indicînd 2—3 spoturi (fig. 4).

Datele obținute nu pot fi comparate prea bine cu cele ale supernatantului. S-ar putea ca o parte din peptidele separate în precipitat să

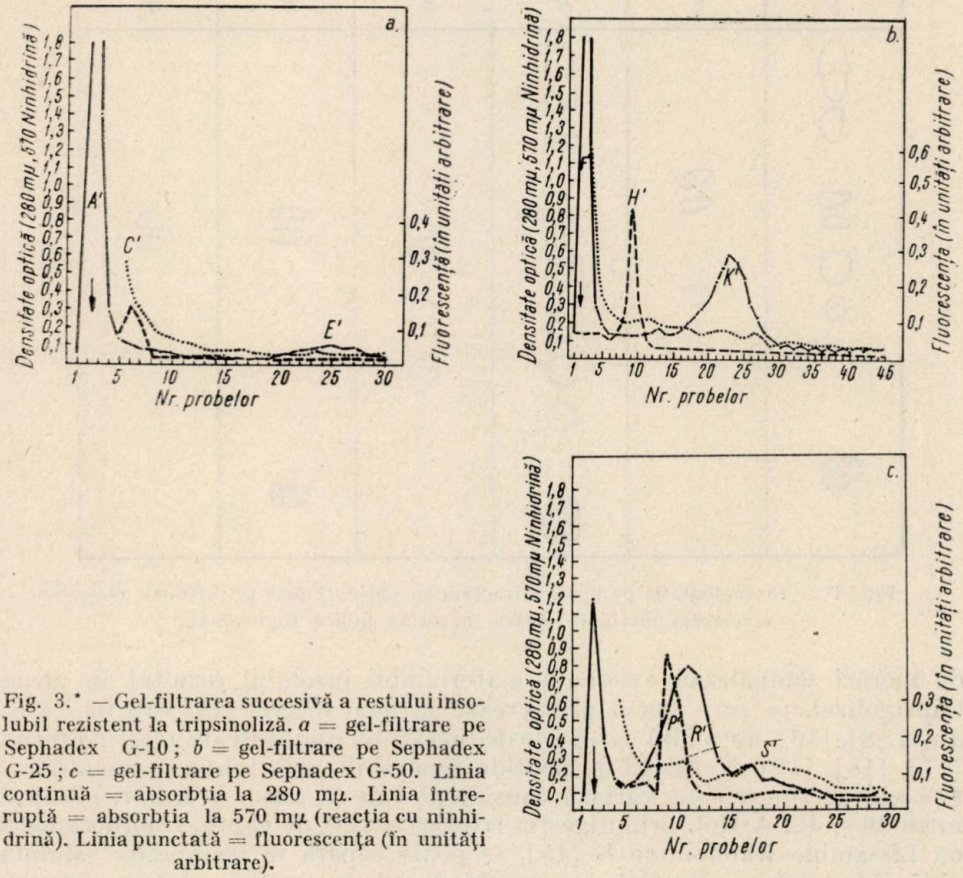


Fig. 3.* — Gel-filtrarea succesivă a restului insolubil rezistent la tripsinoliză. *a* = gel-filtrare pe Sephadex G-10; *b* = gel-filtrare pe Sephadex G-25; *c* = gel-filtrare pe Sephadex G-50. Linia continuă = absorbția la 280 mμ. Linia întreruptă = absorbția la 570 mμ (reacția cu ninhidrină). Linia punctată = fluorescența (în unități arbitrare).

există și în supernatant, însă în cantități diferite (din cauză că separarea celor două materiale s-a făcut doar prin solubilitatea lor diferită în carbonat de amoniu după tripsinoliză).

Aspectul curbelor de gel filtrare și cromatografia ar sugera că în acest material există unele peptide care nu se găsesc în supernatant.

În concluzie, se poate afirma că materialul insolubil se separă prin gel-filtrare succesivă în 7 peptide cu greutate moleculară diferită. Unele din aceste peptide sînt la rîndul lor eterogene, separîndu-se prin cromatografie pe hîrtie în multiple spoturi ninhidrin-pozitive (nici unul fluorescent-

* Piscurile separate se notează cu aceleași litere ca cele ale supernatantului dacă volumele lor de eluție sînt asemănătoare. Pentru a le deosebi se pune semnul prim (').

și care relevă circa 17 peptide diferite. Spotul fluorescent, cu R_F maxim, este dat de DANSIL-ul liber.

În ceea ce privește numărul peptidelor rezultate prin hidroliza triptică a IgG de diferite proveniențe, datele din literatură nu sînt concordante. S-ar putea ca aceasta să se datoreze faptului că lucrările care tratează această problemă o studiază în mod diferit, și anume : o categorie

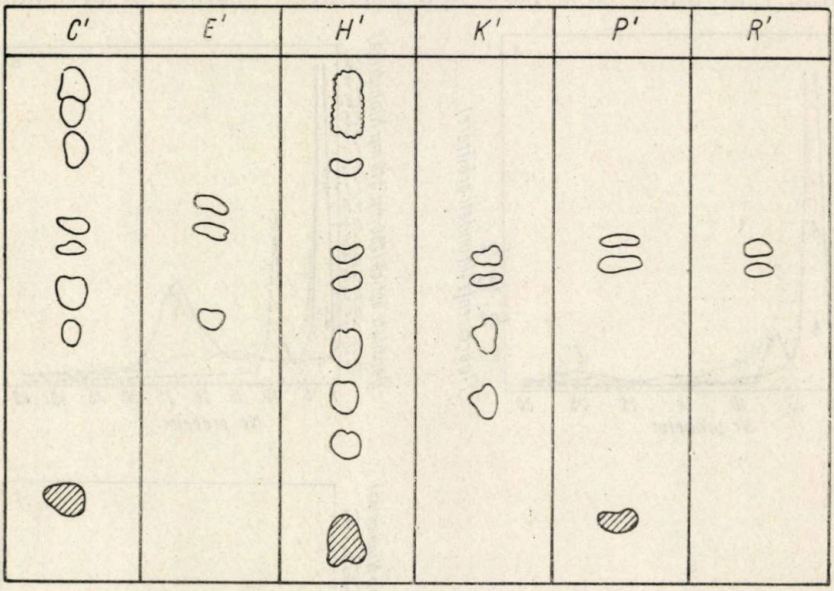


Fig. 4*. — Cromatografia pe hîrtie a fracțiunilor obținute prin gel filtrarea succesivă a restului insolubil. Zonele haşurate indică fluorescența.

de lucrări semnalează existența materialului insolubil rezultat în urma tripsinolizei, pe care sau îl prelucrează în mod diferit [15] sau nu-l studiază [8], [16], iar o altă categorie de lucrări nu amintesc de acest material [17], [18], [19]. Numărul de peptide separabile prin tehnici cromatografice sau de fingerprint variază considerabil de la autor la autor, oscilînd între 20 și 42. Astfel, prin digestia triptică a IgG de capră, fluorocromată cu Lissamine Rhodamine B [15], se poate separa în fracțiunea solubilă obținută după tripsinoliză un număr de 42 de peptide, dintre care 10 fluorescente, iar materialul insolubil, supus digestiei cu chimotripsină, evidențiază 7 spoturi, dintre care 4 fluorescente. Acest din urmă rezultat este asemănător cu cel obținut de noi în cazul materialului insolubil supus gel-filtrării succesive (7 fracțiuni) (fig. 3).

Analiza cromatografică după hidroliza cu HCl

După o hidroliză de 15 minute se constată că apare un spot fluorescent, cu un R_F mijlociu. Poziția acestui spot corespunde aproximativ

* Piscurile separate se notează cu aceleași litere ca cele ale supernatantului dacă volumele lor de eluție sînt asemănătoare. Pentru a le deosebi se pune semnul prim (').

aceleia a DANSIL-alaninei, semnalată de Deyl și Rosmus [6] prin cromatografie în strat subțire în butanol, acid acetic, piridină, apă.

Prelungind hidroliza la o oră și 24 de ore, se mai evidențiază încă un spot, însă mult mai slab fluorescent decît cel al alaninei, și care apare alături de fluorocromul liber (cu R_F maxim).Acest aminoacid nu a putut fi evidențiat. Datele obținute corespund faptului că alanina este aminoacidul N-terminal al lanțului L din molecula IgG. Celălalt aminoacid fluorescent ar putea fi acidul aspartic, acidul glutamic, serina, treonina, valina, leucina (sau izoleucina), identificați, în cantități mici, ca aminoacizi N-terminali pentru lanțul L [20]. DANSIL-alanina a fost identificată în hidrolizate prin cromatografie cu eter de petrol, acid acetic, apă și prin ionoforeză cu acid acetic-piridină, folosind ca aminoacid de referință DANSIL-alanina preparată așa cum s-a arătat la capitolul de „Metode".

Deci, cele trei peptide fluorescente identificate în hidrolizatul triptic ar putea proveni numai din regiunea N-terminală a lanțului L.

Deoarece s-a determinat că o moleculă de IgG fixează două molecule de DANSIL [3], și dacă acceptăm că una dintre ele este fixată la capătul N-terminal al lanțului L, rămîne neclarificat modul în care se leagă de lanțul polipeptidic H cealaltă moleculă de DANSIL. Faptul că lanțul H fixează cu 50% mai mult fluorocrom decît lanțul L este, în aparență, în contradicție cu concluzia noastră că, în afară de alanină, nu există un alt aminoacid puternic fluorescent. Deoarece capătul N-terminal al lanțului H e blocat [21], trebuie admis că DANSIL-ul nu se leagă de lanțul H prin intermediul vreunui aminoacid, ci poate prin intermediul oligozaharidului legat covalent de lanțul H [22].

CONCLUZII

1. După hidroliza triptică a IgG denaturate prin căldură se pot separa cel puțin 15 piscuri alcătuite din peptide cu o greutate moleculară diferită, cuprinsă între valori de pînă la 700 și 30 000. Dintre ele, 38% au o greutate moleculară pînă la 700, 52% pînă la 5 000 și 10% peste 5 000.

2. Majoritatea fracțiunilor separate prin gel-filtrare nu sînt omogene, ci alcătuite dintr-un număr variabil de peptide cu aceeași greutate moleculară și care se pot separa prin cromatografie pe hîrtie. În hidrolizatul de IgG s-au pus în evidență 34 de astfel de peptide.

3. Materialul rămas insolubil după tripsinoliza IgG, analizat în mod similar, relevă prezența a 7 piscuri alcătuite din peptide cu greutate moleculară diferită, care la rîndul lor sînt eterogene și pot fi separate prin cromatografie pe hîrtie în cel puțin 17 componente.

4. S-au identificat 3 peptide fluorescente, dintre care cel puțin o parte conțin alanină și sînt desprinse din porțiunea N-terminală a lanțului L.

5. Gel-filtrarea succesivă poate constitui o metodă de perspectivă pentru izolarea peptidelor ce rezultă din hidroliza enzimatică a proteinelor.

Prezentată la redacție la 2 octombrie 1967

Sectorul de imunochimie,
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România, București

BIBLIOGRAFIE

1. H. D. SCHELL, V. GHEȚIE, *Die Fluoreszenzmarkierung der Serumeiweissstoffe mit 1-dymethyl-amino-naphtalen-5-sulfonsäurechlorid und Reinigung der erhaltenen Konjugate*, Rev. roum. biochim. **1**, 203 (1964).
2. C. ȘELARIU, V. GHEȚIE, S. MIHĂESCU, *Hidroliza cu papaină a γ_2-globulinelor și anticorpilor fluorescenți de iepure*, St. cerc. biochim. **8**, 89 (1965).
3. S. MIHĂESCU, *Distribution of 1-dimethylaminonaphtalene-5-sulphonic acid in the polypeptide chains of rabbit γG-globulin*, Rev. roum. biochim. **4**, 41 (1967).
4. V. GHEȚIE, S. MIHĂESCU, C. ȘELARIU, *The fragmentation of fluorescent rabbit IgG and the intramolecular localization of label*, Al 7-lea Congres Internațional de Biochimie, 19—25 August 1967, Tokyo.
5. W. R. GRAY, B. S. HARTLEY, *A fluorescent end-group reagent for proteins and peptides*, Biochem. J. **89**, 60 P (1963).
6. Z. DEYL, J. ROSMUS, *Thin layer chromatography of Dansyl derivatives*, J. Chromatogr. **20**, 514 (1965).
7. H. RINDERKNECHT, *Ultra-rapid fluorescent labelling of proteins*, Nature **193**, 167 (1962).
8. J. L. GROFF, F. HAUROWITZ, *Comparison of the peptide maps of antibodies against an acidic and a basic determinant group*, Immunochemistry **1**, 31 (1964).
9. S. MOORE, W. N. STEIN, *A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of aminoacids and related compounds*, J. Biol. Chem. **211**, 907 (1954).
10. D. TĂNĂSESCU, *Participarea în metabolismul muscular a aminoacizilor liberi intracelulari*, St. cerc. biochim. **9**, 367 (1966).
11. A. A. BOULTON, I. E. BUSH, *Qualitative and quantitative analysis of aminoacids as their „Dansyl" derivatives*, Biochem. J. **92**, 11 P. (1964).
12. M. KASUYA, H. TAKASHINA, *Tryptic digestion of myosin A labeled with 1-dimethylamino-naphtalene-5-sulfonyl chloride*, J. Biochem. 60, 459 (1966).
13. J. PORATH, *Gel filtration of proteins, peptides and aminoacids*, Biochim. Biophys. Acta *39*, 193 (1960).
14. P. FLODIN, *Dextran gels and their applications in gel filtration*, Uppsala, 1962, p. 72—73.
15. A. A. CHRISTOMANOS, A. DIMITRIADES, *On the chemical structure of the antigen and antibodies bound to fluorescent dyes. I. Structure of the antihuman γ-globulin of the goat bound to the fluorochrome Lissamine Rhodamine B*, Enzymologia Acta Biocatalytica **30**, 15 (1966).
16. B. FRANGIONE, E. C. FRANKLIN, *Structural studies of human immunoglobuline*, Arch. biochem. biophys. **111**, 603 (1965).
17. M. D. GITLIN, E. MERLER, *A comparison of peptides released from rabbit antibodies by enzymatic hydrolysis*, J. exp. Med. **114**, 217 (1961).
18. E. F. GOLD, S. CORDES, M. A. LOPEZ, K. L. KNIGHT, F. HAUROWITZ, *Studies on chicken γ-globulins and hapten specific chicken antibodies*, Immunochemistry **3**, 433 (1966).
19. C. MERRYMAN, B. FRANGIONE, E. C. FRANKLIN, B. BENACERRAF, *Peptide differences in purified mouse antibodies*, Immunochemistry **4**, 31 (1967).
20. M. LANCKMAN, *Structural heterogeneity of L chains in antibodies of restricted specificity*, Nature **210**, 1380 (1966).
21. R. R. PORTER, *Chemical structure of γ-globulin and antibodies*, Brit. Med. Bull. **19**, 197 (1963).
22. V. GHEȚIE, *The localization of 1-dimethylaminonaphtalene-5-sulfonic acid in Fd and Fd' fragments of rabbit IgG*, Rev. roum. Biochim. **5**, (1968).

THE TRYPTIC HYDROLYSIS OF DANS—LABELED RABBIT IgG DENATURED BY HEAT

SUMMARY

The tryptic hydrolysis of the fluorescent IgG denatured by heat was tested by successive gel filtration on Sephadex G—10, G—25 and G—50 in association with the paper chromatography of the peaks separated by gel filtration.

At least 15 peptides were rendered evident from which 38 per cent with a molecular weight up to 700, 52 per cent with a molecular weight up to 5000 and 10 per cent with a molecular weight over 5000.

In their turn the peptides were separated by chromatography into 34 ninhydrin positive spots and in 3 fluorescent ones. Since the paper chromatography point out the presence of the fluorescent alanine, it was concluded that the 3 fluorescent spots arise from the N-terminal region of the L chain which contains the alanine as N-terminal amino acid.

ST. CERC. BIOCHIM. II, 2, 153–157 (1968)

DETERMINAREA CONȚINUTULUI UNOR ALCALOIZI ÎN RĂDĂCINILE DE *VINCA ROSEA* L., SĂNĂTOASĂ SAU INFECTATĂ CU VIRUS

A. GHEORGHIU și ELENA IONESCU-MATIU

Rezumat. — În vederea valorificării rădăcinilor de *Vinca rosea* L. s-a stabilit o metodă prin care s-a dozat în rădăcinile plantelor sănătoase δ-yohimbina și vincaleucoblastina, iar în rădăcinile plantelor infectate cu virus δ-yohimbina, vincaleucoblastina fiind absentă.

Astfel în rădăcinile de *Vinca rosea* L. sănătoasă s-a găsit un conținut în vincaleucoblastină de 0,23% și un conținut în δ-yohimbină de 0,55%.

În rădăcinile plantelor infectate cu virus s-a constatat că procentul de δ-yohimbină este de peste patru ori mai mare decît cel din rădăcinile plantelor sănătoase.

Sensibilitatea plantei *Vinca rosea* L. la infecția cu unii agenți patogeni, în special cu virusuri, ridică o serie de probleme noi în legătură cu extinderea culturilor ei în alte zone ale globului decît cele de origine. *Vinca rosea* L. este folosită în cercetările experimentale de laborator ca plantă test pentru identificarea virusurilor de tipul *aster yellows* [6], [9], [10]. Maramorosch [7] a semnalat apariția unei boli virotice la *Vinca rosea* L. cultivată în cîmp și a izolat din culturile acestei specii un virus capabil să producă fenomene tipice de îngălbenire.

Din observațiile de teren, precum și din cercetările experimentale de seră, am ajuns la concluzia că virusul afectează în cîmp peste 90% din plantele cultivate, producînd fenomene de îngălbenire, filodie, proliferarea florilor și sterilitate și este transmisibil prin cicade [2].

Ținînd seama de aceste fapte, am considerat necesar să studiem în ce măsură infecția virotică influențează cantitatea și calitatea conținutului de alcaloizi din această plantă, în scopul de a stabili acțiunea pe care virusul o poate avea asupra valorii plantelor de *Vinca rosea* L. ca materie primă medicamentoasă pentru obținerea unor alcaloizi cu acțiune anticanceroasă.

În cercetările anterioare [2], [3], folosind metoda cromatografică pe hîrtie la identificarea vincaleucoblastinei, ca și metodele macroscopică și microscopică pentru cunoașterea modificărilor morfoanatomice ale plantei sub influența infecției virotice, am pus în evidență unele caractere diferențiale care ar putea servi la aprecierea valorii acestui produs vegetal.

Astfel, am constatat că plantele infectate cu virus de tipul *aster yellows* au în frunze un conținut redus de alcaloizi (urme), în timp ce în rădăcini conținutul de alcaloizi crește, fiind de două ori mai mare decît în rădăcinile plantelor sănătoase, iar vincaleucoblastina nu se formează în rădăcinile plantei infectate. Aceste fapte ne-au indicat că la *Vinca rosea* L. virusul intensifică procesul de formare a alcaloizilor, că biosinteza acestora are loc în rădăcini și că infecția virotică provoacă totodată și o modificare calitativă a compoziției alcaloizilor, împiedicînd mai ales biosinteza vincaleucoblastinei, principiul activ de bază cu acțiune anticanceroasă.

Chiang și Chen [1] au arătat că intensitatea fluorescenței soluțiilor de yohimbină crește în lumina ultravioletă cînd acestea sînt încălzite cu peroxid de hidrogen și că există o proporționalitate între valorile intensității fluorescenței yohimbinei pure și concentrațiile sale.

De asemenea, Szász și colab. [8] propun pentru punerea în evidență, în lumina ultravioletă, a alcaloizilor din *Vinca rosea* L. ținerea cromatogramelor într-o atmosferă de clor.

Bazîndu-ne pe proprietățile fluorescente ale soluțiilor de yohimbină și vincaleucoblastină, ne-am propus să determinăm conținutul de δ-yohimbină și vincaleucoblastină din rădăcinile de *Vinca rosea* L. sănătoasă și pe cel de δ-yohimbină din rădăcinile de *Vinca rosea* L. infectată cu virus, în scopul valorificării acestei materii prime medicamentoase de natură vegetală.

MATERIAL ȘI METODE

Plantele folosite în cercetările noastre au fost crescute în condițiile de seră [1] indicate și în lucrările anterioare [2], [3] ca : temperatura de 22—24°, umiditatea atmosferică de 70—80%, luminozitate de 16 ore, suplimentată prin lumină fluorescentă. Infectarea cu virus s-a făcut prin altoiri și grefe de țesut, cînd plantele aveau vîrsta de 4 luni. Extracția alcaloizilor s-a făcut cînd plantele aveau vîrsta de 13 luni. Plantele sănătoase aveau la această vîrstă înălțimea de 70—80 cm și grosimea tulpinii la colectare de 1 cm, iar plantele infectate cu virus, de aceeași vîrstă, erau deformate puternic, cu sistemul radicular mult redus, și aveau înălțimea medie de 20—30 cm.

Determinarea umidității produsului vegetal (rădăcini) s-a făcut prin măsurarea pierderii greutății prin încălzire la temperatura de 60°.

Materialul uscat cercetat de noi a avut un conținut în apă de 6% și s-a încadrat în normele de uscare a drogurilor, care prevede pentru rădăcini 4—12% apă.

Pentru separarea și dozarea vincaleucoblastinei și δ-yohimbinei din rădăcinile plantelor sănătoase, precum și a δ-yohimbinei din rădăcinile plantelor infectate cu virus, am procedat astfel :

1. Determinarea curbelor etalon ale δ-yohimbinei și vincaleucoblastinei.

Zece mg δ-yohimbină — s-au dizolvat în acid acetic 5N prin agitare timp de două ore într-un balon cotat de 100 cmc și s-a completat pînă la semn.

Zece ml din această soluție s-au pipetat într-un balon cotat de 100 ml și s-a completat cu acid acetic 5N pînă la semn, realizîndu-se o concentrație în δ-yohimbină de 10 mcg/ml.

---

[1] Mulțumim și pe această cale cercetătorului biolog P. Ploaie, de la Institutul de biologie „Traian Săvulescu" al Acad. R.S.R.

În șase baloane cotate a 10 ml s-a pipetat din această soluție cîte 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml și 6 ml (corespunzînd la 10, 20, 30, 40, 50 și 60 μg/ml yohimbină) peste care s-a adăugat cîte 1 ml soluție 3% de peroxid de hidrogen și s-a completat cu acid acetic 5N pînă la semn. Soluțiile au fost încălzite pe baia de apă la fierbere timp de 45 min, s-au răcit la temperatura camerei, iar intensitățile fluorescenței lor s-au măsurat cu ajutorul ultramicrofluorometrului „Kotaki".

La determinarea curbei etalon a vincaleucoblastinei s-a procedat similar.

2. Determinarea cantitativă a δ-yohimbinei și a vincaleucoblastinei din probele de analizat.

a) *Extragerea alcaloizilor.* 10 g produs vegetal mărunțit V[2] provenit de la *Vinca rosea* L. sănătoasă s-a extras cu o soluție de acid formic 5% (500 ml), timp de 30 min, la vibroextractorul F.S. [5]. Soluția extractivă a fost filtrată și distilată sub presiunea redusă pînă la un volum de cca 10 ml, s-a alcalinizat cu o soluție de hidroxid de sodiu 30% pînă la pH 10 și s-a extras de trei ori cu cîte 10 ml cloroform. Soluția cloroformată a fost distilată sub presiune redusă, iar reziduul a fost luat cu cca 10 ml de acid formic 5%. După alcalinizare cu hidroxid de sodiu 30% pînă la pH 10, alcaloizii s-au extras cu cloroform. Soluția cloroformică a fost concentrată sub presiune redusă pînă la sicitate. Reziduul s-a luat cu acid acetic 5N, s-a filtrat într-un balon cotat de 100 ml și s-a completat pînă la semn cu acid acetic 5N.

În același mod s-a procedat și în cazul extragerii alcaloizilor din rădăcinile de *Vinca rosea* L. infectate cu virus.

Soluțiile astfel obținute au servit la separarea și dozarea vincaleucoblastinei și a δ-yohimbinei.

b) *Separarea alcaloizilor* s-a făcut în aparatul de cromatografie „Chropa", prin tehnica de cromatografie ascendentă, pe hîrtie Whatman nr. 1, propusă de Szász și colab. [8] și adaptată condițiilor noastre de lucru.

Benzile de hîrtie (49 × 9 cm), impregnate cu formamidă prin cufundare timp de 10 minute în acetonă cu 20% formamidă, au fost ținute în aer pînă la îndepărtarea acetonei. Extractele cloroformice de analizat și probele martor de δ-yohimbină și vincaleucoblastină s-au micropipetat pe linia de start trasă cu creionul la 4 cm de la marginea hîrtiei.

Ca fază mobilă s-a folosit un amestec de eter-benzen (1 : 10), saturat cu formamidă adusă la pH 5 cu acid formic anhidru. Timpul de expunere cromatografică a fost de 100 min, la temperatura camerei.

Punerea în evidență a alcaloizilor s-a făcut în lumina ultravioletă, după o prealabilă oxidare prin ținerea cromatogramelor într-o atmosferă de clor și cu reactivul Dragendorff modificat [4].

c) *Dozarea* δ-yohimbinei și a vincaleucoblastinei s-a făcut astfel:

După decuparea spoturilor din spectrele cromatografice corespunzătoare δ-yohimbinei și vincaleucoblastinei, fiecare alcaloid s-a eluat de pe hîrtia cromatografică cu eter etilic. Eluarea s-a făcut într-un vas de sticlă bine închis și într-o atmosferă saturată cu eter etilic.

Eluatele au fost concentrate la volume mici și aduse în baloane cotate de 10 ml, iar eterul etilic a fost îndepărtat prin evaporare. În fiecare balon cotat reziduul a fost dizolvat în acid acetic 5N, s-a adăugat cîte 1 ml din soluția de peroxid de hidrogen 3% și s-a completat pînă la semn cu acid acetic 5N. Soluțiile au fost încălzite timp de 45 minute pe baia de apă adusă la fierbere, apoi au fost răcite la temperatura camerei, iar intensitățile fluorescenței lor s-au măsurat cu ajutorul ultramicrofluorometrului „Kotaki".

---

[2] Gradul de mărunțire corespunzător sitei nr. V.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Folosind la separarea alcaloizilor din *Vinca rosea* L. cromatografia pe hîrtie, am obţinut spectrul cromatografic al rădăcinilor plantelor sănătoase, alcătuit din 7 spoturi alcaloidice, din care am identificat δ-yohimbina şi vincaleucoblastina, iar din spectrul cromatografic al rădăcinilor plantelor infectate cu virus 6 spoturi alcaloidice, din care am identificat δ-yohimbina.

Am stabilit pentru δ-yohimbină şi vincaleucoblastină curbele etalon (tabelele 1 şi 2), cu ajutorul cărora am dozat din spectrul cromato-

Tabela 1

Curba etalon obţinută cu δ-yohimbină

Concentraţia μg/ml	Extincţia
10	29
20	43
30	60
40	74
50	88
60	104

Tabela 2

Curba etalon obţinută cu vincaleucoblastină

Concentraţia μg/ml	Extincţia
10	14
20	27
30	43
40	55
50	68
60	83

grafic obţinut din rădăcinile plantelor sănătoase de *Vinca rosea* L. δ-yohimbina şi vincaleucoblastina, iar din spectrul cromatografic obţinut din rădăcinile plantelor infectate cu virus, δ-yohimbina.

Rezultatele determinărilor cantitative sînt prezentate în tabela 3.

Tabela 3

Determinarea cantitativă a conţinutului în δ-yohimbină şi vincaleucoblastină din rădăcinile plantei *Vinca rosea* L. sănătoasă şi infectată cu virus, cultivată în seră

Produs vegetal	Proveniență	Conţinut în δ-yohimbină (%)	Conţinut în vincaleucoblastină (%)
Rădăcini	Plantă sănătoasă	0,55	0,23
Rădăcini	Plantă infectată cu virus	2,45	—

Din determinările cantitative, am constatat că procentul în δ-yohimbină în rădăcinile provenite de la planta *Vinca rosea* L. infectată cu virus este de peste patru ori mai mare decît cel din rădăcinile de *Vinca rosea* L. sănătoasă. Pe de altă parte, în rădăcinile de *Vinca rosea* L. sănătoasă am găsit un conţinut în vincaleucoblastină de 0,23%.

Aceste determinări cantitative le-am considerat necesare pentru valorificarea produsului vegetal (rădăcini) provenit din *Vinca rosea* L. în δ-yohimbină şi mai ales în vincaleucoblastină, alcaloid cu acţiune anticanceroasă.

CONCLUZII

În vederea valorificării rădăcinilor de *Vinca rosea* L. ca materie primă medicamentoasă, s-a stabilit o metodă prin care s-a dozat în rădăcinile plantelor sănătoase δ-yohimbina și vincaleucoblastina, iar în rădăcinile plantelor infectate cu virus, δ-yohimbina. În rădăcinile de *Vinca rosea* L. sănătoasă s-a găsit un conținut în vincaleucoblastină de 0,23% și un conținut în δ-yohimbină de 0,55%.

În rădăcinile plantelor infectate cu virus s-a constatat că procentul în δ-yohimbină este de peste patru ori mai mare decît cel din rădăcinile plantelor sănătoase.

Prezentată la redacție la 10 noiembrie 1967

Facultatea de farmacie I.M.F. București

BIBLIOGRAFIE

1. Chiang H. C., Chen W. F., *Fluorometric assay of yohimbine*, J. Pharm. Sci. **52**, 808 (1963).
2. Gheorghiu Aurel, Ionescu-Matiu Elena, Ploaie Petre, *Influence de l'infection virale sur la quantité et la qualité de la teneur en alcaloïdes, de Vinca rosea L.*, Rev. roum. Biochim. **3**, 221 (1966).
3. Gheorghiu Aurel, Ionescu-Matiu Elena, *Influence de l'infection virale sur la vincaleucoblastine, alcaloïde à action anticancéreuse de Vinca rosea L., ainsi que sur les caractères morpho-anatomiques de cette plante*, Ann. pharm. franç. (sub tipar).
4. Hais I., Macek K., *Cromatografia pe hîrtie*, Edit. tehnică, București, 1960, p. 748 (traducere).
5. Ionescu-Stoian P., Fait I., Stanciu N., Savopol E., Cruceanu I., *Die Mechanisierung von Arbeitsverfahren in der Apotheke. 3. Mitteilung: Die Vibroextraction, Ein Verfahren zur Herstellung wässriger Extraktlösungen*, Die Pharmazie, **16**, 122 (1961).
6. Kunkel V. L., *Studies on aster yellows*, Amer. J. Botany **13**, 646 (1926).
7. Maramorosch K., *Vinca yellows in Mexico*, Plant disease Reporter **40**, 1104 (1956).
8. Szász K., Kaváts T., Karácsony M. E., Lőrinez Cs., Bayer J., *Über die Alkaloide von immergrün Vinca minor L. II. Die Quantitative Bestimmung und papierchromatographische Trennung der Alkaloide*, Planta Medica **7**, 234 (1959).
9. Valenta V., Musil M., Misiga S., *Investigations on European yellows type Viruses I. The Stolbur virus*, Phytopath. Z. **42**, 1 (1961).
10. Valenta V., Musil M., *Investigation on European yellows — type Viruses II. The Clovre Dwarf and Parastolbur Viruses*, Phytopath. Z. **47**, 38 (1963).

DETERMINATION OF THE CONTENT OF SOME ALKALOIDS IN HEALTHY OR VIRUS-INFECTED ROOTS OF *VINCA ROSEA* L.

Summary

In view of turning to good account the roots of *Vinca rosea* L., a method was devised by which δ-yohimbine and vincaleucoblastine were evaluated in roots of healthy plants and δ-yohimbine in virus-infected plants, vincaleucoblastine being absent.

Thus within healthy *Vinca rosea* L. roots vincaleucoblastine has been found in amount of 0.23% and δ-yohimbine in amount of 0.55%.

In roots of virus-infected plants, it has been found that the percentage of δ-yohimbine was 4 times higher than that in roots of healthy plants.

ST. CERC. BIOCHIM. **11**, 2, 159–166 (1968)

IMPORTANȚA APORTULUI PROTEIC ÎN INTOXICAȚIA CRONICĂ CU TOLUEN

I. GONȚEA, ELENA BISTRICEANU, MIOARA MANEA și MARGARETA DRĂGHICESCU

Rezumat. — Pe 4 loturi a 15 șobolani tineri s-a cercetat rolul ingestiei proteinelor (18,35 față de 9,06 g %) furnizate de cazeină în evoluția intoxicației realizate prin injectarea s.c. a 1 g toluen/kilocorp din 2 în 2 zile timp de 24 de săptămîni, martorii fiind injectați la fel numai cu solventul noxei (oleum helianthi). Pe de o parte intoxicarea a încetinit creșterea și în cazul regimului semiproteic a determinat pierderea în greutate (−7,5%, față de +12% la martor), iar pe de altă parte a provocat scăderea numărului de hematii (cu 20% în lotul normoproteic și cu 27% la cel hipoproteic) și a cantității de hemoglobină (cu 5 și cu 9,6%), diferențele dintre valorile medii fiind statistic semnificative (între $p < 0{,}05$ și $p < 0{,}001$). Cantitatea de acid hipuric eliminat de animalele care au dispus de un regim normoproteic a fost cu 10–12 mg mai mare decît în lotul cu regim semiproteic ($p < 0{,}05$). Se conchide că un aport adecvat de proteine mărește rezistența și favorizează procesul de detoxifiere a organismului în intoxicația cronică cu toluen.

Interesul pentru relația dintre aportul proteic și intoxicația cronică cu toluen rezultă pe de o parte din faptul că, în afara locurilor de preparare (extracție), această hidrocarbură este mult utilizată în industrie, atît ca materie primă la fabricarea altor substanțe (benzaldehidă, acid benzoic, clorură de benzoil, toluidină, zaharină etc.) cît și ca solvent, iar pe de altă parte din constatarea că în organism toluenul este parțial oxidat în acid benzoic, care se unește cu glicocolul și se elimină sub formă de acid hipuric.

$$\underset{\text{toluen}}{C_6H_5-CH_3} \rightarrow \underset{\text{acid benzoic}}{C_6H_5-COOH} \rightarrow \underset{\text{acid hipuric}}{C_6H_5-CO-NH-CH_2-COOH}$$

Atît oxidarea cît și conjugarea se realizează mai ales la nivelul ficatului și sînt catalizate de mai multe enzime, cu participarea adenozin trifosfatului ca furnizor de energie. Acidul benzoic se unește cu coenzima A, transformîndu-se în benzoil-coenzima A, iar glicocolul este activat de glicin-N-acilază [2].

$$\text{Ac. benzoic} \xrightarrow{\text{ATP + CoA}} \text{benzoil CoA} \xrightarrow{\text{glicocol+glicin—acilază}} \text{ac. hipuric}$$

Deși transformările suferite de toluen în organism, fiind catalizate de enzime și, prin glicocol, avînd implicații cu metabolismul amonoacidic, sugerează posibilitatea existenței unei corelații, totuși nu s-a

cercetat rolul exercitat de mărimea aportului proteic pentru rezistenţa la intoxicaţie şi pentru capacitatea de a converti toluenul în acid hipuric. Ţinînd seama de această situaţie şi de locul pe care toluenul îl ocupă în industrie, am considerat util ca, în cadrul cercetărilor întreprinse de mai mulţi ani asupra importanţei factorului alimentar pentru desfăşurarea interacţiunii dintre organism şi un agent chimic, să studiem rolul aportului proteic în evoluţia intoxicaţiei cronice cu această hidrocarbură.

MATERIAL ŞI METODĂ

Experienţele s-au efectuat pe 60 de şobolani albi (tulpina Wistar) tineri, comparabili ca sex, vîrstă şi greutate (iniţial 175 g), care au fost împărţiţi în 4 loturi egale. În tot cursul cercetărilor animalele au fost menţinute în cuşti individuale şi alimentate cu aceeaşi cantitate de hrană (procedeul „*paired feeding*"). S-a folosit o raţie completă şi izocalorică, însă conţinutul ei în proteine (furnizate de cazeină) a fost pentru două loturi de 18,35 g %, iar pentru celelalte două numai de 9,06 g % (tabela 1).

Tabela 1

Compoziţia regimurilor

Produsul	Normoproteic (Loturile I şi II)	Semiproteic (Loturile III şi IV)
Cazeină	19,0 g%	8,0 g%
Amidon	61,0 „	72,0 „
Oleum helianthi	10,0 „	10,0 „
Oleum jecoris	2,0 „	2,0 „
Drojdie de bere uscată	4,0 „	4,0 „
Amestec salin (Osborne-Mendel)	4,0 „	4,0 „
Tocoferol	1,5 mg%	1,5 mg%
Proteine	18,35 g%	9,06 g%

După 10 zile de hrănire cu regimul normoproteic, două din cele 4 loturi de şobolani au continuat să primească aceeaşi dietă, iar celelalte două au fost trecute la regimul semiproteic. Cîte un lot din fiecare din aceste două cupluri a fost ţinut apoi ca martor, iar celălalt a fost intoxicat prin injectarea s.c. a 1 g toluen pur pe kilocorp, din 2 în 2 zile, timp de 24 de săptămîni. Substanţa s-a dizolvat (1 g %) în oleum helianthi şi, spre a înlătura (la interpretarea deosebirilor) efectul înţepăturii „per se" şi al uleiului, martorii au fost injectaţi la fel cu o cantitate egală de solvent (pe kilocorp).

Pentru controlul intoxicării s-a înregistrat săptămînal greutatea corporală şi lunar s-a controlat starea hemato-hemoglobinică, iar pentru a vedea efectul mărimii aportului proteic asupra capacităţii de glicocolo-conjugare, în fiecare lună animalele au fost introduse cîte două zile în cuşti de metabolism, pentru colectarea urinii, în care s-a dozat acidul hipuric prin procedeul Deysson şi Alliot [1]. Spre a vedea dacă noxa are acţiune hepatosteatozantă capabilă să interfereze detoxificarea, la sfîrşitul perioadei de intoxicare s-a recoltat şi cîntărit ficatul, în a cărui substanţă uscată s-a determinat conţinutul de lipide totale (Soxhlet) şi colesterolul (metoda Grigaut).

Tabela 2

Modificarea procentuală medie a greutății corporale în funcție de mărimea aportului proteic la șobolani intoxicați și la martorii lor, injectați cu aceeași cantitate de solvent

Lotul			Variația procentuală a greutății corporale după săptămîni											
Nr.	Regim	Destinație	II	IV	VI	VIII	X	XII	XIV	XVI	XVIII	XX	XXII	XXIV
1	Normoproteic	Intoxicat	−2,7	−5,7	+4,5	+8,4	+12	+11,8	+12,2	+11,9	+8,9	+9,5	+12,2	+13,7
2		Martor	−2,2	+3,0	+7,2	+10,6	+10,9	+9,6	+12,5	+15,2	+15,7	+16,0	+17,9	+18,7
	Semnificația diferenței		n	p<0,003	n	n	n	n	n	n	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05
3	Semiproteic	Intoxicat	−7,8	−9,3	+0,2	+3,1	+5,3	+0,5	+0,9	+0,2	−3,5	−8,0	−7,6	−7,5
4		Martor	−2,7	−6,9	−0,7	+4,8	+9,3	+7,9	+9,8	+10,0	+10,0	+9,0	+11,2	+12
	Semnificația diferențelor între	3−4	n	n	n	n	n	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
		1−3	n	n	n	n	p<0,05	p<0,001	p<0,003	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001

REZULTATE

Indicatorii folosiți pentru controlul intoxicării și pentru sesizarea rolului exercitat de aportul proteic în rezistența organismului au fost studiați sub forma de abateri procentuale față de valorile inițiale, pentru fiecare animal în parte, și din datele astfel obținute s-a calculat media pe lot și eroarea standard. Pentru aflarea rolului exercitat de mărimea aportului proteic s-au comparat între ele valorile loturilor intoxicate, iar pentru interpretarea deosebirilor s-a ținut seama de valorile găsite în loturile de control.

a) *Greutatea corporală* (tabela 2). După o perioadă de 2—4 săptămîni de la începutul injectării uleiului, cu sau fără toluen, în care s-a produs o slăbire, animalele au început să-și recupereze pierderea și apoi să crească în greutate, însă pentru cele supuse dietei semiproteice și intoxicării, creșterea a durat puțin. În timp ce șobolanii menținuți cu același regim semiproteic au continuat adaosul ponderal pînă la finele perioadei de observație (6 luni), depășind greutatea inițială cu 12%, cei injectați cu toluen au slăbit după a patra lună de intoxicare, ajungînd ca la finele perioadei de observație să cîntărească cu 7,5% mai puțin decît la începutul administrării noxei ($p < 0{,}001$). Spre deosebire de cuplul supus regimului semiproteic, animalele care au dispus în continuare de dieta normoproteică au crescut în greutate pînă la încheierea experiențelor, însă adaosul ponderal în lotul intoxicat a fost cu 5% mai redus decît al martorilor ($p < 0{,}05$).

Sporul în greutate al animalelor care în cursul intoxicării au beneficiat în continuare de regimul normoproteic a fost ceva mai mare decît al celor neintoxicate care au primit dieta semiproteică. Cu alte cuvinte, administrarea toluenului a redus creșterea șobolanilor tineri, hrăniți cu o dietă adecvată, la nivelul aceleia realizate de regimul semiproteic, sau că majorarea aportului de proteine a contracarat total efectul noxei asupra cîștigului în greutate al animalelor supuse unui regim mai sărac în material azotat de aceeași calitate.

b) *Hemograma* (tabela 3). După 4—5 săptămîni de intoxicare, numărul de hematii și cantitatea de hemoglobină au început să scadă, reducerea fiind mult mai importantă pentru hematii decît pentru hemoglobină. În loturile de control, injectate numai cu ulei, scăderea față de valorile inițiale a fost nesemnificativă în tot cursul intoxicării, pe cînd în cele intoxicate, la ultimele controale, ea a ajuns să fie statistic asigurată. La finele perioadei de intoxicare, în lotul intoxicat menținut în continuare cu dieta normoproteică, valoarea medie a numărului de hematii a fost cu 20% și aceea a cantității de hemoglobină cu 5% mai reduse (față de — 2% în lotul martor), pe cînd în cel supus regimului semiproteic și intoxicării hematiile au scăzut cu 27% și hemoglobina cu 9,6% (față de 3% și 3,5% la martorii respectivi), diferențele fiind foarte semnificative ($p < 0{,}01$).

c) *Eliminarea de acid hipuric* (tabela 4). Indiferent de mărimea aportului proteic, la șobolanii neintoxicați excreția medie de acid hipuric a variat, în toate perioadele de dozare, între 1,5 și 3,5 mg în 24 ore. Spre deosebire de martori, cantitatea de acid hipuric eliminată în același interval de animalele intoxicate cu toluen a fost de 5—15 ori mai mare. În fiecare perioadă de intoxicare, eliminarea de acid hipuric a fost cu 10—12 mg mai redusă în lotul supus regimului semiproteic decît în cel care a benefi-

Tabela 3

Influența intoxicării cu toluen asupra numărului de hematii și a cantității de hemoglobină la șobolan în funcție de mărimea aportului proteic

Lotul			Variația procentuală a numărului de hematii și a cantității de hemoglobină									
Nr.	Regim	Destinație	30—40 zile		60—67 zile		92—100 zile		120—129 zile		160—168 zile	
			Hematii	Hb.	Hematii	Hb.	Hematii	Hb.	Hematii	Hb.	Hematii	Hb.
1	Normoproteic	Intoxicat	—3,4	—0,6	—9,0	—0,7	—11,7	—2,1	—18,0	—3,8	—20,0	—5,0
2		Martor	—2,8	—0,8	—4,6	—0,7	—4,6	—0,6	—3,7	—2,1	—2,0	—2,0
Semnificația diferenței 1—2									$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$
3	Semiproteic	Intoxicat	—5,5	+4,3	—12,0	—4,4	—17,6	—4,8	—22,0	—5,3	—27,0	—9,6
4		Martor	—1,4	+2,8	—2,6	—5,7	—5,5	—4,9	—3,0	—3,6	—3,0	—3,5
Semnificația diferenței		3—4							$p<0,001$	$p>0,05$	$p<0,001$	$p<0,001$
		1—3							$p>0,05$	$p>0,05$	$p<0,001$	$p<0,001$

ciat de dieta normoproteică, iar diferenţa dintre valorile medii este statistic asigurată ($p < 0,05$).

d) *Greutatea şi conţinutul ficatului în grăsimi* (tabela 5). După cum rezultă din valorile consemnate în tabela 5, indiferent de mărimea aportului proteic, administrarea s.c. a 1 g toluen pe kilocorp din 2 în 2 zile, timp de 24 săptămîni, nu a modificat semnificativ nici greutatea ficatului raportată

Tabela 4

Eliminarea de acid hipuric la şobolani intoxicaţi cu toluen în funcţie de mărimea aportului proteic

Nr.	Lotul: Regim	Lotul: Destinaţie	Cantitatea medie de acid hipuric (mg/24 ore): 40 — 50 zile	53—63 zile	85—97 zile	105—125 zile
1	Normoproteic	Intoxicat	21,45 (±5,8)	25,20 (±3,6)	37,12 (±4,5)	41,64 (±3,8)
2		Martor	3,1 (±0,08)	3,7 (±0,03)	1,66 (±0,02)	3,5 (±0,03)
Semnificaţia diferenţei 1—2			p<0,05	p<0,001	p<0,001	p<0,001
3	Semiproteic	Intoxicat	10,99 (±1,2)	13,09 (±1,6)	26,23 (±3,2)	31,1 (±3,5)
4		Martor	2,18 (±0,04)	2,17 (±0,03)	1,67 (±0,02)	2,25 (±0,03)
Semnificaţia diferenţei 3—4			p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Semnificaţia diferenţei 1—3			p<0,05	p<0,003	p<0,05	p<0,05

Tabela 5

Mărimea ficatului şi conţinutul lui în lipide totale şi în colesterol la şobolani intoxicaţi cu toluen

Nr.	Lotul: Regim	Lotul: Destinaţie	Ficat (g)/100 g corp	Substanţă uscată (g%)	Conţinutul substanţei uscate a ficatului în: Lipide totale (g %)	Colesterol (g %)
1	Normoproteic	Intoxicat	3,01	28,25	9,28	8,43
2		Martor	2,98	28,30	10,6	9,99
	Semnificaţia diferenţei 1—2		p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,001
3	Semiproteic	Intoxicat	3,45	27,79	10,6	7,06
4		Martor	3,39	28,50	12,65	11,3
	Semnificaţia diferenţei 3—4		p>0,05	p>0,05	p<0,001	p<0,001
	Semnificaţia diferenţei 1—3		p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,001

la 100 g corp, nici proporţia de substanţă uscată, dar conţinutul acesteia în lipide totale şi în colesterol a fost semnificativ mai redus la şobolanii din loturile supuse intoxicării decît la cei din loturile martor.

DISCUŢII

Rezultatele obţinute arată că prin injectarea s.c. a 100 mg toluen pe 100 g corp, din 2 în 2 zile, a provocat intoxicarea şobolanilor tineri, însă aceasta a devenit evidentă numai după 4 luni de administrare a noxei şi s-a manifestat prin reducerea adaosului ponderal şi prin anemierea animalelor. Gravitatea intoxicaţiei a fost însă semnificativ influenţată de mărimea aportului proteic. După aceeaşi doză pe kilocorp şi acelaşi număr de injecţii, şobolanii, care au beneficiat de un aport proteic adecvat au continuat să crească în greutate (firește semnificativ mai puţin decît martorii lor), la finele perioadei de intoxicare cîntărind cu 13 % mai mult decît la început, iar cele menţinute cu regimul semiproteic au fost, la încheierea observaţiilor, cu 7,5% mai uşoare. Pe cînd în lotul normoproteic numărul de hematii a scăzut cu 20% şi cantitatea de hemoglobină cu 5%, în cel semiproteic scăderile au ajuns la 27% pentru hematii şi la 9,6% pentru hemoglobină ($p < 0{,}001$).

Avantajul oferit de dieta normoproteică ar putea fi atribuit efectului exercitat de aceasta asupra capacităţii organismului de a inactiva noxa prin oxidare în acid benzoic şi glicocolo-conjugare. Deşi doza de toluen a fost egală, totuşi cantitatea de acid hipuric eliminată în 24 de ore de şobolanii care au beneficiat în continuare de regimul cu conţinut proteic adecvat a fost cu 10—12 mg mai mare decît cea excretată de animalele supuse regimului semiproteic. Scăderea eficienţei reacţiei defensive în cazul hrănirii animalelor cu acest regim se poate datora atît micşorării disponibilului de glicocol, cît şi reducerii intensităţii proceselor metabolice în urma diminuării activităţii enzimatice determinată de insuficienţa aportului proteic.

CONCLUZII

Pe 60 de şobolani tineri comparabili ca vîrstă, sex şi greutate iniţială (175 g), împărţiţi în patru loturi egale, s-a cercetat importanţa mărimii aportului de proteine (18,35 faţă de 9,06 g %) furnizate de cazeină, pentru evoluţia intoxicaţiei realizate prin injectarea s.c. a 1 g toluen pe kilocorp din 2 în 2 zile timp de 24 de săptămîni, martorii fiind injectaţi la fel numai cu solventul noxei (oleum helianthi).

Intoxicarea pe de o parte a încetinit creşterea (+13% faţă de +18%, în lotul neintoxicat) şi în cazul regimului semiproteic a determinat pierderea în greutate (−7,5%, faţă de +12% la martor), iar pe de altă parte a provocat scăderea numărului de hematii cu 20% în lotul normoproteic şi cu 27% în cel hipoproteic şi a cantităţii de hemoglobină cu 5 şi cu 9,6%, diferenţele dintre valorile medii fiind statistic semnificative (între $p < 0{,}05$ şi $p < 0{,}001$). Avantajul prezentat de regimul normoproteic poate fi atribuit favorizării reacţiei de detoxifiere, deoarece cantitatea de acid

hipuric eliminată de animalele care au dispus de această dietă a fost cu 10—12 mg mai mare decît în lotul cu regim semiproteic ($p < 0,05$). Pe baza rezultatelor obținute se poate conchide că un aport adecvat de proteine de origine animală mărește rezistența și favorizează procesul de detoxifiere a organismului în intoxicația cronică cu toluen.

Prezentată la redacție la 1 noiembrie 1967

Catedra de Igiena alimentației I.M.F. București

BIBLIOGRAFIE

1. G. Deysson, M. Alliot, *Dosage de l'acide hyppurique urinaire dans l'épreuve de l'hyppuricurie provoquée*, Bull. Soc. Chim. Biol., **29**, 423—426 (1947).
2. R. T. Williams, *Detoxication mechanisms*, Clin. Pharmacol. Therap., **4**, 234—254 (1963).

THE IMPORTANCE OF THE PROTEIN CONTRIBUTION IN CHRONIC INTOXICATION WITH TOLUEN

SUMMARY

The role of proteins (18.35 to 9.06 g %) from caseine in the evolution of intoxication induced by subcutaneous injection of 1 g toluen per kg body weight every second day during 24 weeks on 4 lots of 15 young rats was examined. Controls were injected in the same manner only with the toluen solvent (*oleum helianthi*).

On the one hand the intoxication reduced the growth and, in the case of semiprotein diet, determined the loss in weight (−7.5% to +12% at the normal), and on the other hand decreased the red cell number (by 20% in the normoproteic lot and by 27% in the hypoproteic one) and the haemoglobin amount (by 5 and 9.6%), the differences between the average values being statistically significant (between $p < 0.05$ and $p < 0.001$). The amount of the hyppuric acid eliminated by the animals with a normoproteic diet, was 10—12 mg higher than in the semiproteic nourished lot ($p < 0.05$). It is concluded that an adequate protein contribution increases the resistance and favours the organism detoxication in chronic intoxication with toluen.

ST. CERC. BIOCHIM. II, 2, 167–172 (1968)

DETERMINAREA COMPARATIVĂ A VITEZEI DE REACȚIE A PLASMINEI ASUPRA FIBRINEI PROVENITE DE LA REUMATICI ȘI MARTORI SĂNĂTOȘI

EVA KÓTAY-LAKATOS

Rezumat. — S-a determinat viteza de reacție a sistemului plasminic la concentrații standard de enzimă și la diferite concentrații de substrat reprezentat de fibrina obținută din plasma bolnavilor de reumatism cronic și a unor martori sănătoși. S-au obținut devieri semnificative ale vitezelor reacției de fibrinoliză în funcție de proveniența fibrinei de la reumatici sau persoane sănătoase.

Cercetările noastre anterioare au arătat că atît componența calitativă a fibrinei și activitatea polarografică a soluțiilor de fibrinogen, cît și comportarea fibrinei ca substrat al reacțiilor enzimatice diferă la bolnavii reumatici cronici față de cei sănătoși [8], [9], [10]. În continuare, am studiat viteza de reacție a fibrinei cu plasmină, folosind ca substrat diferite concentrații de fibrinogen provenind de la bolnavi și sănătoși, cantitatea plasminei și toate celelalte condiții fiind constante.

În sensul ipotezei noastre de lucru, fibrina provenită de la bolnavii reumatici și de la indivizi sănătoși fiind diferită, după cum am arătat mai sus, ar putea să manifeste și o afinitate diferită față de plasmină. În cazul altor enzime, ca al succinatdehidrogenazei, avînd o specificitate absolută, s-a reușit a se stabili faptul că diferența specificității față de formele cis și trans ale substratului nu este în realitate altceva decît consecința diferențelor mari în viteza de reacție [13]. Am presupus că diferențele dintre moleculele patologice și cele sănătoase de fibrină, ca de exemplu repartiția încărcăturilor electrice, configurația sterică, pot avea drept consecință o diferență în viteza de reacție, în condiții standard și cu concentrații identice ale substratelor.

La determinările efectuate am măsurat consecința finală a vitezelor reacției. Produsele de reacție — polipeptide — fiind greu de determinat, am măsurat cantitatea restantă a substratului netransformat. Concentrația plasminei am stabilit-o în funcție de posibilitățile de determinare, în așa fel încît, într-un timp scurt de incubație (3 min), ea să scindeze o cantitate determinabilă de substrat (faza inițială a reacției), însă nu prea mare, pentru ca viteza de reacție să nu fie influențată de produsul final.

MATERIAL ŞI METODE

a. *Urmărirea procesului de inhibiţie cu EACA*

Oprirea efectului plasminei la sfîrşitul incubaţiei am făcut-o prin adăugarea unei soluţii de acid epsilon-aminocaproic (EACA), care, în concentraţii înalte, inhibează nu numai activatorii plasminogenului, ci şi enzima activă [12] (fig. 1). Concentraţia necesară *in vivo* ar fi de 0,06 M,

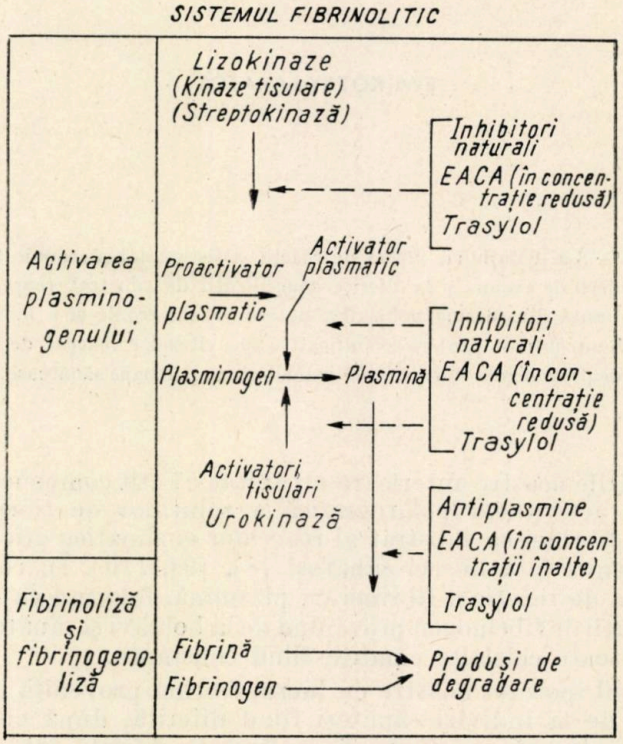


Fig. 1. — Sistemul fibrinolitic.

care însă nu poate fi atinsă în organism. Pe baza acestor date am încercat inhibiţia *in vitro* cu o concentraţie finală de EACA 0,076 M. Pentru inhibarea definitivă a enzimei a trebuit să se răspundă următoarelor două întrebări :

1. Concentraţia finală de 0,076 M este într-adevăr suficientă pentru o inhibiţie totală?

2. Soluţia de EACA adăugată la sistemul de incubaţie heterogen pătrunde prin difuziune într-adevăr în faza de fibrină şi exercită o inhibiţie totală?

Pentru elucidare am alcătuit trei sisteme :

1) În prima serie, am pus în patru eprubete de centrifugă cîte 0,5 ml soluţie de fibrinogen (10 µM, ajungînd la o concentraţie finală de 5,0 µM), 0,1 ml soluţie de EACA 1%, 0,1 ml soluţie de plasmină de 10 µM („Actase", Cilag-Chemie AG) şi 0,4 ml clorură de calciu M/40, conţinînd şi trombină. Am folosit cantităţi identice şi mai departe la determinarea vitezelor de reacţie. Fibrinele formate le-am separat de amestecul de incubaţie după 3, 10, 20 şi 30 min, le-am spălat, le-am hidrolizat şi le-am determinat cantitativ pe baza conţinutului de tirozină, folosind reactivul Folin-Ciocîlteu.

2) În seria a doua, am pus în patru eprubete de centrifugă cîte 0,5 ml soluție de fibrinogen, 0,1 ml soluție de plasmină, 0,4 ml clorură de calciu cu trombină și după trei minute de incubație (la 37° C) am adăugat la fiecare eprubetă cîte 0,1 ml soluție de EACA. Din prima eprubetă am separat fibrina restantă imediat din amestecul de incubație, din celelalte trei abia după 10, 20 și 30 min, determinînd-o cantitativ ca și la prima serie.

3) Cel de-al treilea sistem a servit drept control. Tot în patru eprubete am pus 0,5 ml soluție de fibrinogen, 0,1 ml plasmină și 0,4 ml soluție de clorură de calciu cu trombină. După 3, 10, 20 și 30 min de incubație am oprit fibrinoliza cu 0,1 ml soluție de EACA și am determinat fibrinele restante.

Rezultatele ne-au convins că EACA în concentrația administrată este suficientă pentru oprirea efectului plasminic la o concentrație finală de 1,0 μM, care provoacă o fibrinoliză rapidă : după 30 min de incubație în ultima eprubetă din seria a treia nu au mai rămas nici urme de fibrină. EACA a pătruns și în faza de fibrină și a provocat o inhibiție totală (fig. 2).

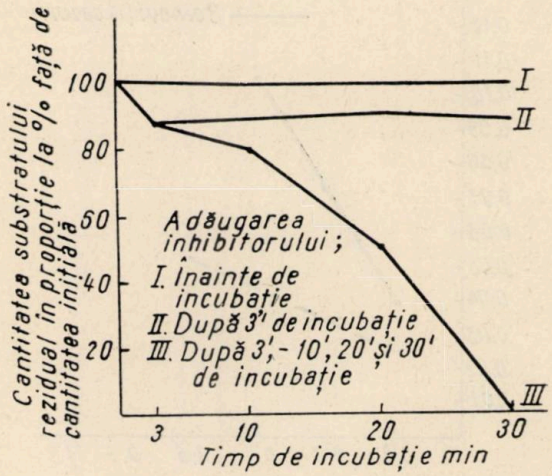


Fig. 2. — Controlul inhibiției prin EACA.

b. *Determinarea vitezelor de reacție*

Din sîngele oxalatat recoltat de la bolnavi suferind de poliartrită cronică evolutivă (14 cazuri) și de la indivizi sănătoși (11 cazuri), am precipitat fibrinogenul cu soluție de Na_2SO_4 (la o concentrație finală de 10,6 %), am spălat cu soluție de Na_2SO_4 de 10,6 % și am redizolvat în sol. fiziologică. Am determinat concentrația soluției de fibrinogen pe baza conținutului de tirozină și am pregătit soluții de 10 μM.

Din această soluție de fibrinogen am făcut diluții de 6,6, 5,0, 4,0 și 3,2 μM. Am pus în două eprubete de centrifugă cîte 0,5 ml soluție de fibrinogen de 10 μM și în alte patru eprubete tot cîte 0,5 ml din diluții. În prima eprubetă am pus 0,1 ml soluție de EACA 1 %, în fiecare 0,1 ml de soluție de plasmină și 0,4 ml clorură de calciu cu trombină, concentrația finală a fibrinogenului fiind de 5,0, 5,0, 3,3, 2,5, 2,0 și 1,6 μM. Am incubat eprubetele în baie de apă la 37° C timp de 3 minute, apoi am adăugat la fiecare din cele cinci amestecuri de incubație 0,1 ml EACA. Fibrinele restante le-am separat, le-am spălat și le-am hidrolizat cu 1 ml NaOH 10 %, la baie de apă fierbinte, timp de 20 min, determinînd apoi cantitățile cu reactivul Folin-Ciocîlteu. Prima eprubetă, în care soluția de EACA a fost adăugată înainte de adăugarea plasminei și de

incubație, a servit ca valoare de bază pentru fibrină, după care am socotit și concentrația exactă a diluțiilor folosite. După diferențele dintre valorile astfel obținute și valorile determinate mai sus, am calculat cantitatea de fibrină degradată, exprimînd-o procentual.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele determinărilor arată că există o diferență netă între vitezele de reacție ale lizei fibrinelor provenite de la bolnavi cu reumatism, față de cele ale indivizilor sănătoși. Viteza de reacție la primul lot este mai mică, fiind necesară o concentrație mai mare de fibrină pentru a

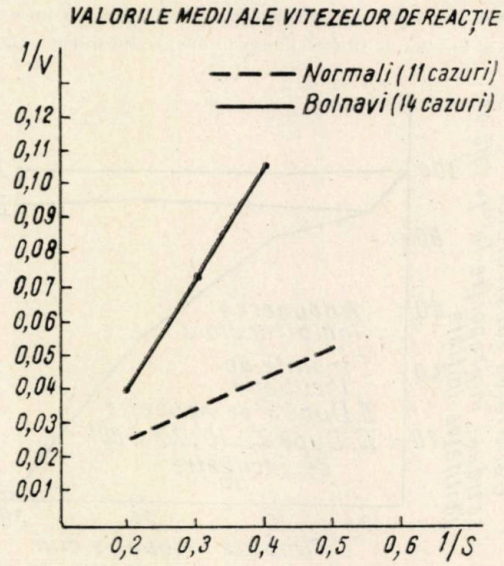


Fig. 3. — Valorile medii ale vitezelor de reacție.

prezenta o viteză de reacție egală cu cea observată la cel de-al doilea lot (sănătoși), iar afinitatea plasminei față de substratul modificat pare să fie mai mică decît față de substratul normal (fig. 3).

Deosebirile calitative dintre substrate produc în același timp și diferențe funcționale. Deosebirea în cinetica observată de noi ne sugerează modificări structurale ale substratelor. Se pune întrebarea, care este cauza acestui fapt : concentrația în general mai mare a glucidelor legate de proteinele din sînge, din care numai o mică parte revin fibrinogenului — sau la bolnavii reumatici există în lanțul polipeptidic al fibrinogenului modificări structurale care explică diferențele funcționale? În ultimă instanță ar putea să aibă loc și combinarea celor două posibilități : datorită modificărilor structurale ale lanțurilor polipeptidice, proteina este mai capabilă de a lega glucidele, iar acestea ar inhiba efectul enzimatic.

Pentru efectul inhibitor al componentului glucidic există observații potrivit cărora , după un tratament cu glucocorticoizi și cu medicamente antidiabetice (ca Phenformin), activitatea fibrinolitică a sîngelui bolnavilor cu reumatism crește [3], [4]. Presupunerea existenței unor dereglări ale

fibrinogenogenezei poate fi corelată cu observațiile referitoare la tulburările metabolismului protidic la o anumită categorie de reumatici, la care crește triptofanul din sînge [5], [6], crește excreția chinureninei [2], precum și cu un oarecare caracter ereditar al bolilor reumatice [7].

CONCLUZII

Determinînd comparativ viteza de reacție a plasminei asupra fibrinei provenite de la normali și de la reumatici, s-a constatat o diferență semnificativă între aceste două grupe : afinitatea enzimei față de substratul patologic a fost mai redusă. Cauzele acestei deosebiri par să fie în primul rînd de ordin structural, și anume creșterea conținutului glucidic al fibrinei.

Prezentată la redacție la 16 mai 1967

Laboratorul clinicii medicale nr. 1, Tg.-Mureș

BIBLIOGRAFIE

1. Abderhalden R., *Klinische Enzymologie*, Stuttgart, G. Thieme, 1958, 252—268.
2. Beetham J. W., Fischer S., Schrochenlocher R., *Tryptophan metabolite excretion in connective tissue diseases demonstrating a difference between rheumatoid spondylitis and rheumatoid arthritis*, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **117**, 756—759 (1964).
3. Chakrabarti R., Fearnley G. R., Elizabeth D. Hocking, *Effect of corticosteroid therapy on fibrinolysis in patients with inflammatory and non-inflammatory conditions*, Brit. med. J., **1**, 534 (1964).
4. Fearnley G. R., Chakrabarti R., Elizabeth D. Hocking, *Phenoformin in rheumatoid arthritis a fibrinolytic approach*, Lancet, **1**, 9—13 (1965).
5. Gáspár G., Bányai B., *A triptofán-anyagcsere szerepe rheumatoid arthritisben*, Rheum. Balneol. Allerg., **2**, 1—8 (1961).
6. Gáspár G., Vida M., Bányai B., *Contribution a l'étude des troubles du métabolisme du sucre chez les malades atteints de P.C.R.*, Rev. Rhumatism, **4**, 180 (1962).
7. Kellgren J. H., *The epidemiology of rheumatic diseases*, Ann. Rheum. Dis., **23**, 109—122 (1964).
8. Kótay Lakatos E., Kifor E., Fall A., *Anomalii calitative în componența fibirinei în boli reumatice* , Rev. Med., Tg.-Mureș, **2**, 176 (1964).
9. Kótay Lakatos E., Kifor E., Olga Kifor, *Contribuții la studiul fibrinogenului cu metoda polarografică în bolile reumatismale*, lucrare comunicată la Consf. Reg. „Metode și tehnici în laboratorul clinic", Timișoara, 1964, sept. 25—26.
10. Lakatos E., *Comportarea fibrinolizei în afecțiunile reumatismale*, Rev. Med., Tg.-Mureș, 1962, 1.
11. Petrányi Gy., *A collagen betegségek autoimmun aethiopathogenezisének problémáiról*, Magyar Belorvosi Archivum, **XV** (1962).
12. Piper W., Buchberger H. G., Simon S., Krüger J., *Fibrinolyse und antifibrinolytische Therapie bei urologischen Operationen. Untersuchungen mit einer neuen Methode der Fibrinolysemessung*, Med. Welt, **65**, 385 (1965).
13. Rappoport S. M., *Medizinische Biochimie*, Volk u. Gesundheit, Berlin, 1965, 147—153.

THE DETERMINATION OF THE REACTION RATE OF PLASMINE ON THE FIBRIN RESULTED FROM RHEUMATICS AND HEALTHY CONTROLS

SUMMARY

The reaction rate of plasmine system at standard enzyme concentrations and at the various substrate concentrations, represented by fibrin plasma from chronic rheumatic patients and normal individuals, was determined.

Significant standard deviations of fibrinolysis rate were observed when fibrin substrate resulted from rheumatic patients instead of healthy individuals was used.

ST. CERC. BIOCHIM. II, 2, 173–180(1968)

PARTICIPAREA GLICOLIZEI LA BIOSINTEZA FOSFOCREATINEI DIN MUȘCHII GASTROCNEMIENI DE BROASCĂ PERFUZAȚI

CORNELIU MEDEȘAN

Rezumat. – Mușchii gastrocnemieni izolați, tetanizați și păstrați 1 sau 4 ore în soluție Ringer-bicarbonat oxigenată, nu au posibilitatea să refacă nivelul normal al fosfocreatinei (PC), chiar și în cazul folosirii unor durate de tetanizare scurte de 5 sau 10 secunde.

La mușchii perfuzați maximum 1 oră cu soluție Ringer-bicarbonat, refacerea nivelului inițial al PC are loc numai în cazul efectuării unor tetanizări de scurtă durată, maximum 15 secunde. După excitații de durată mai mare, PC nu a revenit la valorile normale. Deoarece la broaștele normale, cît și la cele cu măduva spinării distrusă, după tetanizări de lungă durată se refac nivelul normal al PC, autorul consideră că în cazul perfuzării mușchilor sînt frînate sau blocate anumite procese metabolice care participă la biosinteza fosfocreatinei musculare.

Se emite ipoteza că biosinteza PC din mușchii supuși tetanizărilor scurte se efectuează pe seama acidului adenozintrifosforic (ATP) format din glicoliză, în timp ce după tetanizări de lungă durată, din ATP-ul format în cursul respirației și fosforilării oxidative.

Dovezile experimentale care se aduc sînt : *a*) la mușchii perfuzați, biosinteza PC are loc în condiții de anaerobioză ; b) perfuzia cu soluție Ringer-bicarbonat ce conține un inhibitor al glicolizei (acid monoiodacetic) blochează sinteza PC după tetanizări scurte (5 sec).

În cursul activității musculare, necesarul energetic este acoperit prin consumarea celor două substanțe macroergice principale : fosfocreatina (PC) și acidul adenozintrifosforic (ATP). Refacerea lor are loc, după cum au arătat studiile *in vitro* efectuate pe mușchi izolați sau pe omogenate, prin intermediul glicolizei, în cursul căreia se formează trei moli de ATP, iar conform reacției lui Lohmann se reformează fosfocreatina scindată în contracție :

creatină + ATP $\rightleftarrows$ creatinfosfat + ADP

În aceleași condiții experimentale (*in vitro*), în ultimul timp (1956, 1958) Cori și colab. [1], [2] au semnalat posibilitatea fosforilării directe a creatinei prin transferul unei grupări acil-P de la ac. 1,3-difosfogliceric la creatina liberă.

Cu toate acestea, pînă în prezent nu s-a putut pune în evidență în mod direct și satisfăcător, în mușchii izolați, refacerea fosfocreatinei consumate în cursul contracției musculare, adică readucerea acesteia între limitele normale ale mușchiului în repaus. De aici se poate deduce

că, biosinteza fosfocreatinei implică un proces mult mai complex decît s-a crezut și care nu poate să fie lămurit decît în condiții experimentale cît mai apropiate de cele *in vivo*.

Din acest motiv, am considerat că este necesar să urmărim aceste aspecte pe mușchii perfuzați *in situ*. Despre avantajele pe care metoda perfuziei le oferă în studiul biochimismului muscular am avut prilejul să relatăm într-o lucrare anterioară [3]. Pe scurt, ea ne permite :

— să introducem rapid pe o cale firească (cea circulatorie) anumite substanțe active, în intimitatea țesutului ;

— să lucrăm pe un țesut intact ;

— să dozăm componentele chimice antrenate de lichidul de perfuzie ;

— să studiem simultan atît contracția musculară pe care o putem înregistra pe chimograf, cît și influența anumitor substanțe asupra acesteia.

În lucrarea prezentă ne-am propus să urmărim condițiile în care are lor refacerea nivelului normal al fosfocreatinei musculare scindate în urma tetanizărilor la care au fost supuși mușchii perfuzați cu diferite soluții fiziologice. Inhibarea glicolizei am realizat-o cu iodoacetat.

MATERIAL ȘI METODE

S-a lucrat pe broaște (*R. ridibunda*) imobilizate prin distrugerea măduvei spinării cu 12 ore înainte de perfuzie.

Perfuzia mușchilor (de la unul din picioarele posterioare) s-a făcut după tehnica lui Trendelemburg [4], căreia i s-au adus unele modificări menționate într-o lucrare anterioară [3] Tetanizările au fost de durate scurte sau lungi : 5, 10 respectiv 15 secunde, 1 minut, respectiv 5 minute.

Perfuzia a durat maximum 1 oră, iar mușchiul omolog neexcitat și neperfuzat, a constituit martorul.

În lichidul de perfuzie s-a barbotat fie carbogen (95% O_2 + 5% CO_2), fie azot. Soluția fiziologică folosită la perfuzia mușchilor a fost soluția lui Boyle și Conway, fără fosfați (soluția Ringer-bicarbonat) [5].

După o oră de perfuzie, s-au secționat rapid ambele picioare, s-a îndepărtat pielea și s-au izolat cu grijă mușchii gastrocnemieni care s-au înghețat apoi imediat în azot lichid, s-au mojarat și s-au analizat, dozîndu-se fosfocreatina cu ajutorul metodei lui A.M. Alexeeva [7], [8].

Am considerat că datele obținute pe mușchi tetanizați și perfuzați trebuie să fie comparate atît cu cele rezultate din experiențe efectuate pe mușchi izolați, cît și cu cele efectuate pe broaște paralizate prin distrugerea măduvei spinării, fără efectuarea perfuziei mușchilor. Era necesară o astfel de comparație, pentru a vedea în ce măsură, în aceste condiții, există diferențe sau eventual asemănări în ce privește resinteza fosfocreatinei din mușchi.

În toate seriile de experiențe, exprimarea rezultatelor s-a făcut în creatinină dozată (formată în urma acțiunii molibdatului de amoniu în mediu acid asupra fosfocreatinei), precum și în fosfocreatină, care a fost evaluată prin calcul.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Dintr-o lucrare anterioară [9] s-a văzut că mușchii izolați, tetanizați și păstrați timp de 1 sau 4 ore în soluții fiziologice de diferite compoziții nu au posibilitatea să refacă fosfocreatina. Acest aspect a fost reluat în

cursul lucrării prezente, constatîndu-se că și în cazul folosirii unor durate de tetanizare scurte, de 5, respectiv 10 secunde, nu se reface nivelul normal al PC. Din tabela 1 se desprinde în mod evident această concluzie.

Tabela 1

Valorile medii* ale fosfocreatinei din mușchii gastrocnemieni de broască izolați ținuți în soluție Ringer-bicarbonat oxigenată. Unul din mușchi a fost tetanizat în prealabil cu 1,65 mA, 20 imp./sec-5 ms/impuls: 45 ms pauză între impulsuri

Durata imersării în soluție fiziologică (ore)	MUȘCHI STÎNG REPAUS		MUȘCHI DREPT TETANIZAT			Observații
	Creatinină (mg/g mușchi) (determ.)	Fosfocreatină (mg/g mușchi) (calculat)	Durata tetanizării (sec)	Creatinină (mg/g mușchi) (determ.)	Fosfocreatină (mg/g mușchi) (calculat)	
1	2,10	3,92	5	1,60	2,98	Nu se reface nivelul fosfocreatinei
4	1,94	3,62	5	1,53	2,85	
1	2,11	3,93	10	0,98	1,82	

* Valorile reprezintă media a 8 determinări.

S-a determinat în continuare nivelul fosfocreatinei din mușchii proveniți de la broaște cu măduva spinării distrusă și ai căror mușchi de la un picior au fost tetanizați. Din tabela 2 se remarcă și în această variantă experimentală scăderi semnificative ale nivelului fosfocreatinei, care deși nu sînt de amploarea celor consemnate în tabela 1, pot ajunge în cazul tetanizărilor de durate mari (5 minute) pînă la 43% din valoarea normală.

Tabela 2

Valorile medii* ale fosfocreatinei din mușchii gastrocnemieni proveniți de la broaște cu măduva spinării distrusă. Unul din mușchi a fost tetanizat, apoi după un interval de timp s-a determinat fosfocreatina

MUȘCHI STÎNG REPAUS		MUȘCHI DREPT TETANIZAT				OBSERVAȚII
Creatinină (mg/g mușchi) (determ.)	Fosfocreatină (mg/g mușchi) (calculat)	Durata tetanizării	Timpul de la tetanizare pînă la determ. PC (min)	Creatinină (mg/g mușchi) (determ.)	Fosfocreatină (mg/g mușchi) (calculat)	
2,56	4,78	5 sec	0	1,96	3,65	ușoară scădere a fosfocreatinei; refacere în 15 min
2,11	3,94	5 sec	15	2,18	4,07	
2,45	4,57	10 sec	0	1,66	3,10	scădere mai pronunțată a PC.-Revenire la valorile anterioare în 30 min
2,14	4,50	10 sec	15	1,87	3,49	
2,23	4,16	10 sec	30	2,21	4,12	
2,26	4,12	15 sec	0	1,31	2,44	scăderi și mai evidente ale fosfocreatinei. Revenire la valorile anterioare în 60 min
2,15	4,01	5 min	0	0,94	1,75	
1,86	3,48	5 min	60	1,96	3,65	

* Valorile reprezintă media a 8 determinări

Trebuie menționat aici că în cazul prelungirii peste 5 minute a duratei tetanizărilor nivelul fosfocreatinei scade și mai mult decît în cazul anterior, cînd se foloseau durate scurte de tetanizare.

La aceste loturi de animale — broaște cu măduva spinării distrusă și la care nu se efectuează perfuzia mușchilor — determinarea fosfocreatinei după anumite intervale de timp de la tetanizare relevă o revenire la valorile normale. Astfel, din tabela 2 se observă că după tetanizări de 5, 10 respectiv 15 secunde, revenirea se face după 15 minute. În cazul unor tetanizări de mai lungă durată, revenirea fosfocreatinei la valorile normale are loc după un interval de timp mai mare.

Mai trebuia să stabilim dacă fosfocreatina se reface și în cazul cînd, după tetanizare, mușchii au fost perfuzați durate de timp variabile. Din tabela 3 apare evident că după tetanizări timp de 5, 10 sau 15 secunde sînt necesare pentru refacerea nivelului normal al fosfocreatinei următoarele durate de timp de perfuzie a mușchilor : 15, 15 respectiv 30 minute, aceasta în cazul cînd în soluția Ringer se barbotează oxigen.

Tabela 3

Valorile medii* ale fosfocreatinei din mușchii gastrocnemieni de broască cu măduva spinării distrusă cu 12 ore înainte de experiență. Unul din mușchi a fost perfuzat cu soluție Ringer-bicarbonat și tetanizat cu 1,65 mA ; 20 imp./sec ; 5 ms/impuls ; 45 ms pauză. Duratele perfuzării și tetanizării sînt variabile

MUȘCHI STÎNG REPAUS		MUȘCHI DREPT STIMULAT ȘI TETANIZAT					OBS.
Creatinină (mg/g mușchi) (determ.)	Fosfocreatină (mg/g mușchi) (calculat)	Gazul barbotat în sol. de perfuzie	Durata tetanizării	Timpul de la tetanizare pînă la determ. PC (min)	Creatinină (mg/g mușchi) (determ.)	Fosfocreatină (mg/g mușchi) (calculat)	
2,26	4,22	azot	5 sec	15	2,12	3,95	Refacerea PC după
2,23	4,16	,,	5 sec	60	2,25	4,20	15 min
1,75	2,37	,,	10 sec	30	1,79	3,34	Refacerea PC
1,86	3,47	,,	30 sec	60	1,24	2,31	Nu se mai reface fosfocreatina
1,88	3,51	,,	1 min	60	0,70	1,30	
1,97	3,67	,,	5 min	60	0,51	0,53	
1,94	3,62	oxigen	5 sec	15	2,07	3,86	Refacerea fosfocreatinei
1,98	3,69	,,	15 sec	30	1,92	3,58	

* Valorile reprezintă media a 8 determinări.

În variantele la care în soluția de perfuzie se barbotează azot, duratele de timp sînt ceva mai mari, și anume 15, 30, 60 minute.

Pentru precizarea condițiilor optime necesare refacerii fosfocreatinei scindate în urma tetanizărilor cu durate mai mari de 15 secunde a mușchilor, am recurs la perfuzarea lor cu diferite substanțe dizolvate în soluția Ringer. Astfel, am utilizat diferite substanțe care intervin în desfășurarea unor reacții metabolice, cum ar fi : fructozo-1,6-difosfatul, cisteina, piruvatul. Am constatat că nici una din substanțele utilizate nu favorizează refacerea fosfocreatinei.

Aceasta ne-a făcut să presupunem că în condițiile noastre experimentale, deși barbotam în soluțiile de perfuzie carbogen, totuși oxigenarea țesutului muscular nu decurgea în condiții optime. Din acest motiv, am efectuat perfuzii ale mușchilor cu : hematii de broască spălate și suspendate în soluții oxigenate, cu sînge total de broască, dar toate acestea au dus la rezultate negative.

Date similare s-au obținut și atunci cînd s-a lucrat pe broaște imobilizate prin curarizare cu Flaxedil (2 mg/animal), demonstrîndu-se și pe această cale că integritatea anatomică a măduvei spinării nu este o condiție esențială pentru refacerea nivelului normal al fosfocreatinei.

Aceste date dovedesc că în mușchii perfuzați refacerea nivelului fosfocreatinei poate să aibă loc numai în cazul efectuării unor tetanizări de scurtă durată, de maximum 15 secunde. În cazul folosirii unor excitații de durată mai mare, nivelul fosfocreatinei nu a mai putut fi adus la valorile normale chiar și atunci cînd în lichidul de perfuzie erau dizolvate diferite componente cu rol în metabolismul muscular. Bineînțeles că în ultimul caz rămîne deschisă posibilitatea ca aceste substanțe să nu pătrundă în celula musculară chiar și în cazul perfuzării mușchiului.

O altă concluzie importantă ce se desprinde din aceste experiențe este aceea că, spre deosebire de ceea ce se întîmplă fie la broaștele normale, fie la cele cu măduva spinării distrusă, situații în care după tetanizări de lungă durată *nivelul normal al fosfocreatinei se reface*, — în cazul perfuzării mușchilor anumite reacții metabolice sînt frînate sau blocate. Tocmai această situație, constatată din experiențele efectuate, ne-a permis să presupunem că biosinteza fosfocreatinei din mușchii supuși tetanizărilor scurte și perfuzați se pare că are loc pe alte căi decît în cazul tetanizărilor de lungă durată. Această ipoteză a fost întărită prin unele fapte cunoscute din literatură [10], [11], [12] care atestă că în urma unor tetanosuri scurte, efectuate pe mușchi izolați, se produce o intensificare masivă a glicolizei musculare, în timp ce excitațiile de lungă durată, dimpotrivă, inhibă glicoliza. Sîntem de părere că în cazul tetanizărilor scurte, fosfocreatina musculară se reface grabnic pe seama energiei (vezi ATP, acid 1,3-difosfogliceric) rezultate din glicoliză, care constituie așadar factorul principal. O dovadă încă insuficientă că lucrurile s-ar petrece astfel o avem în experiențele în care refacerea nivelului fosfocreatinei din mușchii tetanizați s-a obținut în condiții de anaerobioză, adică prin barbotarea în soluție a azotului. După cum se vede din tabela 3, în acest caz, după tetanizări scurte, nivelul fosfocreatinei revine la valori apropiate de cele găsite anterior.

Pentru a aduce o dovadă directă a rolului glicolizei în refacerea nivelului fosfocreatinei musculare, am efectuat exact aceleași variante experimentale descrise mai sus, cu deosebirea că în soluția de perfuzie (Ringer-bicarbonat) s-a dizolvat acid monoiodacetic într-o concentrație finală de 1 mM, sau 0,5 mM, iar gazul de barbotare a fost azotul.

Într-o primă etapă s-a dovedit că simpla perfuzie a mușchiului cu această soluție fiziologică ce conține acid monoiodacetic nu are nici o influență asupra nivelului fosfocreatinei (tabela 4).

În a doua etapă a experiențelor perfuzia cu această soluție s-a efectuat după tetanizarea mușchiului timp de 5 secunde. Rezultatele,

consemnate în tabela 5, relevă imposibilitatea refacerii nivelului fosfocreatinei în aceste condiții.

Blocarea sintezei fosfocreatinei în aceste experiențe am fi tentați s-o atribuim acțiunii inhibitoare pe care iodoacetatul — otravă tioloprivă —

Tabela 4

Valorile medii* ale fosfocreatinei din mușchii gastrocnemieni de broască cu măduva spinării distrusă cu 12 ore înainte de experiență. Unul din mușchi a fost perfuzat 1 oră cu soluție Ringer-bicarbonat ce conținea acid monoiodacetic și în care s-a barbotat azot

MUȘCHI STÎNG MARTOR		MUȘCHI DREPT PERFUZAT		Concentrația acidului monoiodacetic folosit
Creatinină (mg/g mușchi) (determ.)	Fosfocreatină (mg/g mușchi) (calculată)	Creatinină (mg/g mușchi) (determ.)	Fosfocreatină (mg/g mușchi) (calculată)	
1,89	3,52	1,97	3,67	1 mM
2,03	3,79	1,91	3,56	0,5 mM

* Valorile reprezintă media a 8 determinări.

ar putea-o avea asupra creatinkinazei, enzima care asigură desfășurarea reacției lui Lohmann. În această privință, toți cercetătorii consideră că enzima este inhibată, numai în stare pură (izolată), de cantități foarte mici de iodoacetat, fiind din acest punct de vedere la fel de sensibilă ca și 3-fosfogliceraldehid dehidrogenaza. Alta este situația atunci cînd mușchiul se tratează cu iodoacetat și abia apoi se extrag și se examinează 3-fosfogliceraldehid dehidrogenaza și creatinkinaza; în acest caz, prima enzimă este inhibată complet, pe cînd cea de-a doua nu este afectată. Acest efect s-ar datora protecției pe care o realizează diferitele substanțe prezente în celulă (PC, ATP, ADP) [13], [14].

Tabela 5

Valorile medii* ale fosfocreatinei din mușchii gastrocnemieni de broască cu măduva spinării distrusă cu 12 ore înainte de experiență. Unul din mușchi a fost tetanizat 5 secunde și apoi perfuzat 1 oră cu soluție Ringer-bicarbonat în care s-a barbotat azot. Curentul folosit era de 1,65 mA; 20 imp./sec: 5 ms/impuls; 45 ms pauză între impulsuri

MUȘCHI STÎNG MARTOR		MUȘCHI DREPT TETANIZAT ȘI PERFUZAT		Concentrația acidului monoiodacetic folosit
Creatinină (mg/g) mușchi) (determ.)	Fosfocreatină (mg/g mușchi) (calculată)	Creatinină (mg/g mușchi) (determ.)	Fosfocreatină (mg/g mușchi) (calculată)	
2,09	3,90	1,42	2,44	1 mM
2,12	3,95	1,78	3,32	0,5 mM

* Valorile reprezintă media a 8 determinări.

Din toate acestea trebuie să conchidem că în ciuda marii sensibilități a creatinkinazei în stare pură, situația este diferită în mușchiul intact

Ar fi de menționat aici, doar în treacăt, faptul că în unele experiențe de perfuzie cu iodoacetat, la temperaturi relativ ridicate, în jur de 27°C (vara), unii mușchi deveneau rigizi după 60 minute de perfuzie chiar fără să fi fost stimulați electric. La acești mușchi nivelul fosfocreatinei era scăzut cu 40%.

Această constatare este într-o anumită măsură în acord cu datele experimentale [15] care au remarcat dependența rigidității de temperatură, adică pe măsură ce temperatura se apropie de 30°C, rigiditatea se instalează mai repede (după contracții provocate).

În sfîrșit, rămîne să ne spunem părerea privitor la observațiile consemnate în lucrare, după care, în cazul stimulărilor scurte, refacerea nivelului fosfocreatinei se efectuează prompt. Raportîndu-ne la animalul de experiență — în cazul nostru broasca — acesta nu efectuează eforturi lungi și susținute decît în cazuri extrem de rare. Am observat că o broască silită să execute sărituri în continuu, prin excitări mecanice, obosește în decurs de aproximativ 30—60 secunde, fiind complet epuizată, fenomen evidențiat atît prin suprimarea reflexului de redresare, cît și prin scăderea considerabilă a nivelului fosfocreatinei musculare [8]. Un asemenea animal pare că este paralizat. Așadar, broaștele efectuează în mod obișnuit eforturi scurte, existînd pentru aceasta mecanisme prompte de refacere a fosfocreatinei, și anume energia provenită pe cale glicolitică. În cazul cînd eforturile sînt de durată mai mare în refacerea fosfocreatinei sînt angajate și alte nivele metabolice, respectiv respirația și fosforilarea oxidativă.

În lumina datelor pe care le-am obținut în lucrarea de față, prin folosirea perfuziilor de mușchi, credem că în condițiile unor excitații de scurtă durată calea principală și mai rapidă de biosinteză a fosfocreatinei este prin intermediul glicolizei.

Bineînțeles că aceste date mai trebuie verificate și prin utilizarea altor variante experimentale pe care, de altfel, le efectuăm în momentul de față.

Mulțumim lui Tr. Benția pentru asistența tehnică.

Prezentat la redacție la 12 decembrie 1967

Institutul de biochimie
al
Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. O. Cori, F. Abarca, R. Frenkel, A. Traverso-Cori, *Synthesis of phosphocreatine by enzymes from heart and skeletal muscle*, Nature **178**, 1231—1233 (1956).
2. O. Cori, A. Traverso-Cori, M. Lagarrigue, F. Marcus, *Enzymic phosphorylation of Creatine by 1,3-diphosphoglyceric acid*, Biochem. J. **70**, 633—641 (1958).
3. C. Medeșan, *La perfusion des muscles striés, moyen d'investigation de la biochimie musculaire*, Rev. roum. biochim. **4**, 363—371 (1966).
4. J. Gautrelet, *Eléments de technique physiologique*, Masson, Paris, 355—357 (1932).
5. P. J. Boyle, J. Conway, *Potassium accumulation in muscle and associated changes*, J. Physiol. **100**, 1 (1941).
6. W. F. Mommaerts, K. Seraydarian, G. Maréchal, *Work and chemical changes in isotonic muscular contractions*, Biochim. Biophys. Acta **57**, 12 (1962).

7. A. M. ALEXEEVA, *K voprosu o prevrachtchenii kreatinfosfata v kreatinin i o novom metode opredelenia kreatinfosfata*, Biohimiia **16**, 97 (1951).
8. C. MEDEŞAN, *Compararea unor metode de dozare a fosfocreatinei musculare în diferite condiţii experimentale*, St. cerc. biochim. **7**, 67 (1964).
9. C. MEDEŞAN, *Le niveau de la phosphocréatine après administration respectivement immersion des muscles dans des solutions de phosphates et de créatine*, Rev. roum. biochim. **3**, 303–312 (1964).
10. C. F. CORI, *Regulation of enzyme activity in muscle during work*, în *Enzymes, units of biological structure and function*, sub. red. O. H. GAEBLER, Academic Press, New York, 1956.
11. W. H. DANFORTH, E. HELMREICH, C. F. CORI, *The effect of contraction and of epinephrine on the phosphorylase activity of frog sartorius muscle*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., **48**, 1191 (1962).
12. W. H. DANFORTH, E. HELMREICH, *Regulation of glycolysis in muscle. I. The conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in frog sartorius muscle*, J. biol. Chem. **239**, 3139 (1964).
13. F. D. CARLSON, A. SINGER, *The creatine phosphoryl-transfer reaction in iodoacetate poisoned muscle*, J. gen. Physiol. **43**, 301–313 (1959).
14. P. PADIEU, W.F.H.M. MOMMAERTS, *Creatine phosphoryltransferase and phosphoglyceraldehide dehidrogenase in iodoacetate poisoned muscle*, Biochim. Biophys. Acta **37**, 72–76 (1960).
15. G. MARÉCHAL, *Développement de la contracture iodoacétique du muscle strié par tétanisation prolongée*, Arch. Intern. Physiol. Biochim. **66**, 182–196 (1958).

PARTICIPATION OF GLYCOLYSIS TO PHOSPHOCREATINE BIOSYNTHESIS IN PERFUSED FROG GASTROCNEMIUS MUSCLES

SUMMARY

Isolated and tetanized gastrocnemius muscles maintained for 1 or 4 hours in oxygenized Ringer-bicarbonate solution are no longer capable of restoring the normal phosphocreatine (PC) level, even when short tetanisations (5 or 10 sec) are applied.

The restoration of the initial PC level in muscles perfused for one hour at the most with Ringer-bicarbonate solution, takes place only when short tetanisations (15 sec) are applied. After longer stimulations PC does not recover normal values. As a normal PC level occurs in either normal or spinalized frogs subjected to long tetanisations, the author believes that some metabolic processes involved in muscle phosphocreatine biosynthesis are hindered or blocked in perfused muscles.

The author also assumes that PC biosynthesis in shortly tetanized muscles is achieved on the account of ATP formed during the glycolytic pathway ; after longer tetanisations, PC biosynthesis occurs on the account of ATP formed during respiration and oxidative phosphorylation.

Some experimental findings are given : *a*) PC biosynthesis in perfused muscles takes place underanaerobiosis ; *g*) perfusion with Ringer-bicarbonate solution containing monoiodacetic acid blocks PC resynthesis after short tetanisations (5 sec).

ST. CERC. BIOCHIM. **11**, 2, 181–185 (1968)

ACŢIUNEA APEI OXIGENATE ŞI A ALTOR SUBSTANŢE ASUPRA INHIBĂRII CU CISTEINĂ A FOSFATAZEI ALCALINE

I. A. MOLNAR şi JANETTE WINTER

Rezumat. — S-a studiat influenţa apei oxigenate, ionului de magneziu, extractului de prostată şi hidrolizatului de ficat asupra efectului inhibitor al cisteinei asupra fosfatazei alcaline din rinichi de porc.

Apa oxigenată are un efect protector faţă de inhibarea cu cisteină; efectul protector maxim de 92% s-a observat la concentraţia echivalent molară ($1{,}4 \times 10^{-3}$) de apă oxigenată faţă de cisteină, ceea ce arată că cisteina oxidată la forma cistină nu inhibează enzima. La concentraţii mai mari de apă oxigenată apare din nou inhibarea enzimei, datorită apei oxigenate. Ionul de magneziu la concentraţia de 10^{-2} M are un efect protector de 80%. Cu extractele opoterapice (extract de prostată şi hidrolizat de ficat) s-au obţinut efecte protectoare de 13%, respectiv 20%, care scad prin mărirea concentraţiei. Acest efect protector nu poate fi considerat ca specific extractului din ţesutul respectiv.

Munricio [1], studiind influenţa diferiţilor factori asupra acţiunii fosfatazei renale, asupra glicerofosfatului de sodiu la 38°, a constatat că activitatea maximă a enzimei este situată între pH 8,85 ... 9,16. Sub influenţa ionului Mg^{++} activitatea creşte, la concentraţii mari de Mg^{++} activitatea este inhibată. Studiind influenţa acizilor aminaţi, a constatat că cistina în concentraţie de 0,05 M şi 0,5 M inhibează activitatea enzimei. Schuster [2] a studiat acţiunea inhibitoare a cisteinei şi a cianurii asupra fosfatazelor alcaline provenite din diferite ţesuturi, în funcţie de pH, şi a constatat că acţiunea inhibitorie creşte cu creşterea valorii pH. Lazdunsky şi Ouellet [3] au studiat influenţa cisteinei asupra fosfatazei alcaline intestinale. La pH 9,5 cisteina joacă rolul unui inhibitor necompetitiv. Autorii atribuie acţiunea inhibitoare funcţiei tiol, ceea ce concordă cu constatările anterioare ale lui Akamatsu de inhibare a fosfatazei alcaline renale cu tioglicolaţi [4]. Lazdunsky obţine o inhibare totală în prezenţa de 3×10^{-4} M cisteină la pH 9,77. Cox şi Mac Leod [5] au studiat acţiunea aminoacizilor asupra fosfatazei alcaline obţinute din cordonul rinichiului uman, la pH 8,1 şi 8,8, şi au constatat că prin adăugare de L-cistină sau L-cisteină se poate obţine inhibarea enzimei. De exemplu, L-cisteina în concentraţie de $0{,}4 - 0{,}8 \times 10^{-3}$ M scade activitatea enzimatică la a 5-a parte. Autorii au observat că acţiunea inhibitoare a cisteinei creşte în funcţie de pH, la pH 8,5 sau 9,6 ea fiind cu mult mai mare decît la pH 8,1, ceea ce este în concordanţă cu constatările lui Schuster. După aceşti autori,

pentru a avea efect inhibitor, gruparea —SH trebuie să fie disociată, ceea ce are loc cu creşterea pH-ului. Gershun [6] a constatat acţiunea inhibitoare a cisteinei în concentraţie de 0,8 $\times$ 10^{-3} M la 37° asupra fosfatazei din lisate obţinute din celule de HeLa.

În lucrarea noastră ne-am propus studierea influenţei diferitelor substanţe asupra inhibării fosfatazei alcaline din rinichi de porc.

Pentru efectuarea acestor lucrări ne-am gîndit că este recomandabil să se lucreze pe de o parte în condiţii de activitate optimă a enzimei, pe de altă parte în condiţii în care acţiunea inhibitoare a cisteinei este maximă, ceea ce se poate realiza în jur de pH 9, iar cantitatea de cisteină folosită să fie cea cu care se obţine o inhibare în proporţie de cca 2/3.

Prin probe de tatonare am stabilit proporţiile de enzimă şi de cisteină pentru a realiza condiţiile de lucru dorite.

În experienţele noastre am studiat influenţa diferiţilor factori ca : apă oxigenată, ionul magneziu (Mg^{++}) şi diferite extracte opoterapice asupra inhibării acţiunii fosfatazei alcaline de către cisteină.

MATERIAL ŞI METODE

— *Fosfataza alcalină* s-a preparat după metoda lui Bodansky [1] din rinichi de porc. Din 1 kg rinichi am obţinut 1,01 g fosfatază alcalină.

— *Soluţie de cisteină* : 200 mg L-cisteină se dizolvă în 100 ml apă distilată (sol. 0,0168 M).

— *Soluţie de fosfatază alcalină* : 100 mg fosfatază alcalină se dizolvă în 100 ml soluţie tampon de borat de sodiu, pH 9 (1,9% borat de sodiu).

— *Soluţie de substrat* : 21,8 mg fenil fosfat disodic şi 1,9 g borit de sodiu se dizolvă în 100 ml apă distilată.

— *Soluţie de metabisulfit de sodiu* : 6,4 g metabisulfit de sodiu se dizolvă în 100 ml apă distilată.

— *Soluţie fiziologică* de clorură de sodiu.

— *Soluţie de molibdat de amoniu* : 5 g molibdat de amoniu se dizolvă în 100 ml acid sulfuric N.

— *Soluţie de hidrochinonă* : 2,0 g hidrochinonă se dizolvă în puţină apă distilată cu 0,2 ml acid sulfuric, apoi se completează cu apă distilată la 100 ml.

— *Soluţie de carbonat-sulfit* : 144 g carbonat de sodiu crist. şi 20 g sulfit de sodiu crist. Se dizolvă în apă distilată şi se aduce la 1000 ml.

— *Soluţie de apă oxigenată* : sol. 3% de apă oxigenată.

Determinarea constă în stabilirea cantităţii de substrat scindat în condiţii experimentale, fără cisteină şi în prezenţa unei cantităţi fixe de cisteină, în prezenţa de cisteină şi de cantităţi variabile din produsul al cărui efect se studiază.

Pentru fiecare determinare se pregătesc o serie de eprubete după schema de mai jos :

Nr.	Soluţie de fosfatază (ml)	Apă dist. (ml)	Soluţie de cisteină (ml)	Soluţie din subst. de studiat (ml)
1	3,0	0,6	0,0	0,0
2	3,0	0,3	0,3	0,0
3	3,0	0,0	0,3	0,3

pentru fiecare determinare se iau 2 serii paralele.

Imediat după amestecarea lor se ţin timp de 2 ore în baie de apă la 37°.

Separat se pregătesc 2 serii de eprubete. Într-o serie se pun cîte 0,2 ml din soluţiile ţinute timp de 2 ore la 37°, la care se adaugă 1 ml de soluţie de substrat (fenilfosfat disodic), iar în cealaltă serie de eprubete se adaugă cîte 0,2 ml din soluţiile ţinute timp de 2 ore la 37°, la care se adaugă şi 1 ml soluţie de clorură de sodiu. Eprubetele se ţin din nou timp de 1 oră exact la 37°. Apoi pentru determinarea fosfatului scindat la fiecare eprubetă se adaugă cîte 0,5 ml soluţie de bisulfit, 0,15 ml soluţie de molibdat de amoniu, 0,5 ml soluţie de hidrochinonă, se agită energic, apoi se lasă în repaus timp de 5 minute, se adaugă 10 ml soluţie de carbonat sulfit, se agită din nou şi se determină extincţia la 700 mμ, în cuva de 1 cm, faţă de seria de eprubete fără substrat.

Extincţiile observate în eprubetele cu fosfatază s-au situat în jur de 0,40, iar cele cu adaos de cisteină în jur de 0,15, ceea ce arată că în condiţiile noastre experimentale inhibarea fosfatazei alcaline se produce în proporţie de cca 63%. În eprubetele cu adaos de apă oxigenată sau eventual alte substanţe de testat extincţiile observate sînt cuprinse între aceste două valori.

Efectul protector faţă de inhibarea fosfatazei alcaline de către cisteină se poate obţine din ecuaţia :

$$P = \frac{Em - Ep}{Em - Ec} \times 100$$

în care P este efectul protector,

Em este extincţia citită pentru soluţia de fosfatază,

Ec este extincţia citită pentru soluţia de fosfatază şi cisteină,

Ep este extincţia citită pentru soluţia de fosfatază şi cisteină la care s-a adăugat substanţa de cercetat.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Pentru studiul influenţei apei oxigenate, dintr-o soluţie de concentraţie cunoscută am făcut diferite diluţii adăugînd cîte 0,3 ml din soluţii diluate la probă, avînd un volum total de 3,6 ml. Concentraţia apei oxigenate în probă a fost cuprinsă între 2×10^{-4} şi 2×10^{-1} M. Concentraţia cisteinei în probă a fost de $1{,}4 \times 10^{-3}$ M. Rezultatele obţinute sînt trecute în figura 1.

Din datele experimentale rezultă că apa oxigenată protejează fosfataza alcalină faţă de inhibarea cu cisteină, efectul protector maxim fiind de 92% la concentraţia de apă oxigenată de $1{,}4 \times 10^{-3}$ M în probă, ceea ce corespunde la concentraţia echivalentă în cisteină. Mărind concentraţia apei oxigenate, se obţine o inhibare a fosfatazei alcaline, inhibare pe care nu o putem atribui cisteinei, ci apei oxigenate.

Pentru studiul influenţei ionului de magneziu s-au adăugat cantităţi crescînde de clorură de magneziu în probă. Rezultatele obţinute sînt trecute în figura 2. Din aceste date se vede că ionul de magneziu protejează fosfataza alcalină împotriva inhibării cu cisteină, la o concentraţie de 10^{-2} M efectul protector fiind de cca 80%.

Pentru studiul influenţei unor extracte opoterapice am folosit un extract hidroalcoolic de prostată de taur, evaporat la sec, şi un hidrolizat pancreatic de ficat de bovine (avînd raportul N aminic/N total : 0,50) preparat de noi. Rezultatele obţinute sînt redate în figurile 3 şi 4. Din aceste date se vede că atît extractul de prostată cît şi hidrolizatul de ficat, în concentraţii mici, au un efect protector relativ mic, de 20 respectiv 13%,

față de acțiunea cisteinei; prin creșterea concentrației acestor extracte în probă, efectul protector scade.

Experimentînd mai multe probe de extract de prostată, s-au găsit fluctuații de la o șarjă la alta. Efectul protector maxim s-a observat la concentrații cuprinse între 6 ... 12 mg în proba de 3,6 ml, ceea ce corespunde la 1,65 — 3,3 g extract uscat de prostată într-un litru, iar în cazul hidrolizatului de ficat în jur de 0,8 g la litru.

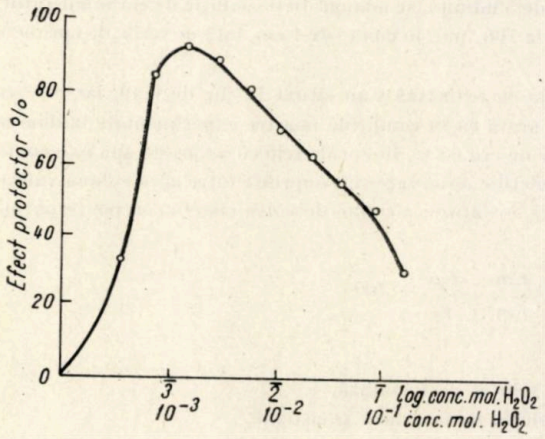


Fig. 1. — Efectul apei oxigenate asupra fosfatazei alcaline inhibate cu cisteină.

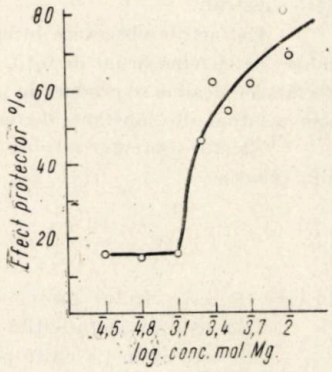


Fig. 2. — Efectul ionului de magneziu asupra fosfatazei alcaline inhibate cu cisteină.

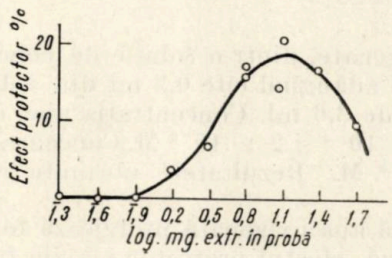


Fig. 3. — Efectul extractului de prostată asupra fosfatazei alcaline inhibate cu cisteină.

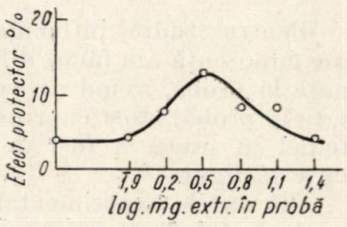


Fig. 4. — Efectul hidrolizatului de ficat asupra fosfatazei alcaline inhibate cu cisteină.

CONCLUZII

Din experiențele efectuate s-a văzut că apa oxigenată protejează fosfataza alcalină față de efectul inhibitor al cisteinei. Această protejare atinge valoarea maximă atunci cînd concentrația molară a apei oxigenate este egală cu aceea a cisteinei. Sub influența apei oxigenate cisteina se oxidează în cistină, prin urmare la această concentrație nu există nici o acțiune datorită cisteinei, nici apei oxigenate, și se poate conchide că cistina nu are acțiune inhibitoare asupra enzimei. Presupunem că în lucrările autorilor [1], [5] care au obținut inhibarea enzimei cu cistină, o parte din cistină a fost redusă în mediul de reacție la cisteină. La concen-

trații mai mari de apă oxigenată apare iarăși inhibarea fosfatazei alcaline, ceea ce nu se mai poate atribui în nici un caz cisteinei, ci acțiunii directe a excesului de apă oxigenată care acționează prin alt mecanism.

Ionul magneziu de asemenea protejează enzima față de inhibarea cu cisteină, ceea ce este în concordanță cu acțiunea cunoscută a ionului de magneziu de a potența activitatea fosfatazei alcaline și de a o proteja față de diferiți inhibitori. Pentru a obține același grad de protecție este nevoie de o proporție mai mare de ioni de magneziu decît în cazul folosirii apei oxigenate.

În cazul extractelor opoterapice (extract de prostată și hidrolizat de ficat), la o anumită concentrație apare un ușor efect protector, de 13 respectiv 20%, care scade prin mărirea concentrației. Avînd în vedere complexitatea compoziției acestor extracte care conțin aminoacizi, peptide, purine, hidrați de carbon și substanțe anorganice, nu putem da o interpretare a fenomenului observat. În orice caz, efectul observat nu-l putem atribui ca fiind specific extractului din țesutul respectiv.

Prezentată la redacție la 4 decembrie 1967

Secția biosinteze
Institutul de cercetări chimico-farmaceutice

BIBLIOGRAFIE

1. A. M. Munricio, Rev. Real. acad. scienc. exact fis. y nat. (Madrid), **44**, 233 (1950).
2. L. Schuster, Arch. Biochem. Biophys. **75**, 345 (1958).
3. M. Lazdunsky, L. Ouellet, Canad. J. Biochem. Physiol. **40**, 1619 (1962).
4. S. Akamatsu, Y. Murakoshi, Arch. Biochem. Biophys. **69**, 353 (1952).
5. R. P. Cox, C. M. Mac Leod, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. **49**, 504 (1963).
6. V. A. Gershun, St. Rab. Inst. Țitol. Akad. Nauk SSSR. **10**, 58 (1966).
7. O. Bodansky, Z. physiol. Chem. **232**, 165 (1935).

THE ACTION OF HYDROGEN PEROXIDE AND OTHER SUBSTANCES ON THE INHIBITION OF ALKALINE PHOSPHATASE BY CYSTEINE

SUMMARY

The influence of hydrogen peroxide, Mg^{++} ions, prostatic extract and liver hydrolysate on the inhibitory effect of cysteine on alkaline phosphatase from pig kidney was studied.

The H_2O_2 protects the enzyme against the inhibition by cysteine. The greatest effect (92%) was obtained at a mol. equivalent concentration of 1.44×10^{-3} H_2O_2 to cysteine. This shows that oxidated cysteine does not inhibit the enzyme. At higher H_2O_2 concentrations enzyme inhibition takes place due to the H_2O_2. The Mg^{++} ion has a protective effect of 80% at a concentration of 10^{-2} M. Protective effects of 13% resp. 20% were obtained with opoteratic extracts (prostatic extract and liver hydrolysate). This effect decreases with higher concentrations. The protective effect cannot be considered as a feature of the respective tissue extract.

ST. CERC. BIOCHIM. 11, 2, 187–189 (1968)

NOTE DE LABORATOR

REALIZAREA UNEI ENZIMOPROTEINOGRAME PENTRU CATALAZĂ

VICTORIA ALEXANDRESCU şi FLORIN MIHĂILESCU

Rezumat.— Se poate folosi suprapunerea metodei lui Uriel pentru determinarea activităţii catalazei şi a metodei de colorare a proteinelor cu amidoschwarz. Se evită astfel manipularea celor două jumătăţi de gel.

Analiza electroforetică a făcut posibilă cercetarea diferitelor forme moleculare pe care le prezintă aceiaşi enzimă. În acest scop s-a folosit electroforeza în mediu lichid, pe hîrtie, pe gel de agaroză, agar, amidon, poliacrilamidă etc.

Cu aceste metode au fost şi sînt cercetate şi izoenzimele catalazei din cele mai diverse materiale biologice [1], [2], [3].

Pentru punerea în evidenţă a activităţii enzimatice se foloseşte fie tăierea electroforegramei în benzi subţiri paralele cu startul, eluarea enzimei respective şi determinarea activităţii ei în eluat în prezenţa substratului specific, fie o tehnică histochimică care evidenţiază enzimograma respectivă.

Pentru catalază există trei metode curente de evidenţiere. Două bazate pe activitatea ei catalazică de a descompune apa oxigenată şi eliberarea oxigenului molecular în mediu, metoda lui Uriel [4] care se pretează foarte bine pentru gelul de agar, şi metoda lui Hale şi Renwick [3] pe gelul de amidon sau de agar cu adaus de amidon, care se bazează pe oxidarea iodurii de potasiu în mediu slab acid, de către apa oxigenată nedescompusă, cu eliberarea de iod molecular, astfel încît zonele fără activitate catalazică devin albastre, pe cînd cele cu activitate catalazică rămîn incolore. A treia metodă se bazează pe activitatea peroxidazică a catalazei în prezenţa catecholului [5] sau pirrogalolului [1].

În cadrul cercetărilor noastre privind izoenzimele din formaţiunile seminţei de porumb (germenul, scutelul, endospermul) am folosit ca mediu de separare gelul de agar, pentru caracterizarea proteinelor solubile şi a izocatalazelor.

Cu acest prilej am ajuns la concluzia că se poate folosi în mod curent suprapunerea metodei lui Uriel pentru determinarea activităţii catalazei în gel de agar, cu metoda de colorare a proteinelor pe electroforegrame cu amidoschwarz [6]. Metoda obişnuită descrisă în literatură şi folosită pentru a se găsi corespondenţa între benzile cu activitate enzimatică şi fracţiunile proteice constă în tăierea gelului în două părţi în lung, în plan

vertical sau orizontal. Una din aceste părți se fixează și se colorează pentru proteine, iar cealaltă se prelucrează pentru a se obține pe ea enzimograma.

Noi am modificat această tehnică în sensul că am eliminat tăierea gelului. Pe aceiași placă cu gel am evidențiat atît benzile catalazei, cît și fracțiunile proteice în modul următor : după terminarea electroforezei, gelul de agar era scufundat în soluție 0,1 M de apă oxigenată, ca în tehnica lui Uriel, pînă ce în porțiunile de gel ce cuprind catalaza se formau bule de oxigen într-un număr suficient de mare pentru a fi ușor vizibile. Dacă ele apar mai greu, placa nu se lăsa totuși în soluție mai mult de 5 minute, din două motive : pentru ca acțiunea prelungită a apei oxigenate să nu inactiveze enzima și pentru ca gelul să nu se dezlipească de placă și bulele de oxigen să difuzeze, deformînd imaginea fracțiunilor catalazice. Plăcile se scoteau la aer și se așteptа aproximativ 20 — 30 minute, în care timp se formau bulele, apoi se spălau cu apă distilată și se imersau în soluția de fixare (acid acetic 2% în alcool etilic 60%), unde se țineau maximum 3 ore. După aceasta plăcile se uscau lent sub hîrtie de filtru, iar proteinele se colorau cu amidoschwarz 10 B.

Astfel, tăierea gelului nu mai este necesară și deci manipularea celor două jumătăți de gel este evitată. Posibilitatea apariției erorilor prin uscarea diferită a celor două jumătăți de geluri, mai ales în regiunea startului, este suprimată. În plus, investigarea catalazelor devine mult mai comodă, ele putînd fi localizate pe benzile proteice fără nici o greutate, neobservîndu-se nici o interacțiune între reactivii utilizați în cele două tehnici. Tehnica se poate aplica, cu rezultate foarte bune cînd există un raport convenabil între cantitatea de proteină totală a extractului și activitatea catalazică. De ex. la semințe. Considerăm că această metodă de „citire" directă a catalazelor pe fracțiunile proteice este indicată pentru cazurile cînd se urmărește simultan punerea lor în evidență. Această suprapunere a celor două tehnici se poate face numai atunci cînd se folosește un agar în care să se formeze bule mici de oxigen. Fiind mici, ele nu deformează fracțiunile proteice și nici nu împiedică fixarea colorantului de proteine. Pentru aceasta am preferat să utilizăm „Special agar noble" produs de NBC—Cleveland, Ohio, față de „Purified agar", Difco, U.S.A.

Această metodă am folosit-o cu succes pentru evidențierea izocatalazelor din germenul, scutelul și endospermul seminței de porumb [7].

Prezentată la redacție la 22 ianuarie 1968

Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. R. Hall, *Proteins and catalase isoenzimes from Fusarium solani and their taxonomic significance*, Aust. J. Biol. Sci. **20**, 419 (1967).
2. L. Beckman, J. G. Scandalios, J. L. Brewbaker, *Catalase hybrid ensymes in maize*, Science **146**, 1174 (1964).
3. A. J. Hale, J. H. Renwick, *A method for the identification of catalase in starch gels*, Biochem. J. **80**, 49 P (1961).
4. J. Uriel, *Detection des activités catalasiques et peroxydasiques de l'hémoglobine après électrophorèse en gélose*, Bull. Soc. Chim. Biol. **40**, 277 (1958).

5. K. Rudolph, M. A. Stahmann, *Interactions of peroxidases and catalases between Phaseolus vulgaris* and *Pseudomonas phaseolicola*, Nature **204**, 474 (1964).
6. P. Grabar, P. Burtin, *Analyse immuno-électrophorétique. Ses applications aux liquides biologiques*, Masson, Paris, 1960, p. 38.
7. V. Alexandrescu, F. Mihăilescu, *Proteinele solubile și izoenzimele catalazei și peroxidazei din mugurașul plus radicula, scutelul și endospermul seminței de porumb*, Rev. roum. Biochim. **5**, (1968) (în pregătire).

AN ENZYMOPROTEINOGRAM FOR CATALASE

SUMMARY

The superposition of the Uriel method for the determination of catalase activity and of the method of the protein coloration with amidoschwarz can be used. In this way the manipulation of the two halves of gel is avoided.

Dr. ILIE COSMULESCU

În seara zilei de 24 noiembrie 1967 s-a stins din viaţă doctorul Ilie Cosmulescu, una dintre cele mai distinse personalităţi pe care le-a avut laboratorul clinic din ţara noastră, fost membru al Societăţii de chimie biologică din Paris, asistent al clinicii de terapie medicală a Facultăţii de medicină din Paris, la prof. Rathery, şi membru al Societăţii de ştiinţe medicale, secţia laborator clinic, din ţara noastră.

Născut la 13 aprilie 1901, în Bucureşti, a absolvit Facultatea de medicină în 1928, urmînd apoi studii superioare la Facultatea de ştiinţe din Paris, de unde obţine certificatul pentru specialitatea chimie biologică în 1938.

În desfăşurarea activităţii sale de medic cu pregătire şi înţelegere de biochimist, a parcurs întreaga filieră a treptelor ierarhice profesionale, de la extern, preparator, asistent de laborator, şef de lucrări, medic primar şef de laborator al Serviciului I clinic din Spitalul Central şi apoi al laboratorului Spitalului „I.C. Frimu" din Bucureşti, unde a lucrat şi în colectivul de cercetări al Academiei Republicii Socialiste România, condus de prof. S. Iagnov, ca cercetător ştiinţific şi şef de laborator, din 1949 pînă în 1958.

În cariera sa de cercetător ştiinţific şi şef de laborator, dr. Cosmulescu a publicat 90 de lucrări, articole, memorii, monografii, apărute în reviste străine, revistele Academiei, manuale pentru tehnicieni şi laboranţi. Pentru colaborarea avută la monografia *Proteinemia* a fost distins cu Premiul de stat cl. a II-a, în 1955.

În activitatea sa a abordat variate şi interesante linii de explorare biochimică, în special în metabolismele glucidic şi protidic, dovedind în lucrările sale imaginaţie de experimentator, judecată ascuţită, intuiţie sigură, simţ critic, măsură, expresie limpede şi atrăgătoare. Ca stil şi ţinută de lucru, dr. Cosmulescu a fost un clasic în ştiinţă.

În perioada de tinereţe este printre primii biochimişti medicali din ţara noastră care au abordat prin metode noi, moderne pe vremea aceea, probleme de metabolism legate de clinică. Astfel, a descris fenomenul, necunoscut la acea dată, al *hiperglicemiei iniţiale*, care survine după injecţia de insulină ; a studiat experimental, pe cîine, şi a dovedit *rolul splinei în metabolismul hidraţilor de carbon* ; a studiat, în colaborare cu dr. Litarczeck şi dr. G. Dinischiotu, curba de disociere a hemoglobinei şi a pus în evidenţă rolul glutationului redus intraglobular, ca factor determinant în afinitatea hemoglobinei pentru oxigen (primele lucrări de acest fel din literatură).

În perioada de la Paris a studiat, împreună cu prof. Rathery, ceea ce se cunoştea atunci ca „*les sucres protidiques*", glicoproteinele şi mucopoli-

zaharizii de astăzi, intuind importanța biologică a acestor substanțe pentru imunologie și procesele de colagenizare.

Din activitatea depusă în Spitalul Central, pe lîngă studiile de metabolism glucidic, dozările de lactacidemie, care se făceau atunci sporadic la noi în țară, subliniez o lucrare în care s-a vădit simțul de subtil observator științific al dr. Cosmulescu, și anume: *Cloruro-cristalizarea în lichidul cefalorahidian.* Acest test s-a impus pentru decelarea participării organice reacționale într-un sindrom mintal.

Dar cea mai interesantă intuiție a sa a fost aceea asupra *mecanismului imunologic de pozitivare* a testelor de disproteinemie, despre care a publicat primul memoriu din țara noastră (în 1949, în Editura Academiei), aducînd contribuții originale prin *testul cu apă distilată și acela cu licoid-heparină.* Dr. Cosmulescu socotea că hiper-gamma-globulinemia din cursul hepatitelor cronice și acute este *expresia creșterii anticorpilor de autoagresiune,* care se produc ca răspuns la antigenele hepatice, puse în circulație prin procesele necrotice și degenerative ale acestui organ. Ideea autoagresiunii este astăzi ridicată la rang de concepție imunopatologică, iar dr. Cosmulescu poate fi considerat unul dintre promotorii acestei concepții.

Fire modestă și rezervată, lucid, subtil și întotdeauna cu mult umor, a trecut prin viață discret, izolat, puțin cunoscut, lăsînd celor care l-au prețuit amintirea unui om cu totul deosebit.

Dr. Marcela Zamfirescu-Gheorghiu
Institutul de medicină internă
al Academiei Republicii
Socialiste România

BIBLIOGRAFIE SELECȚIONATĂ A LUCRĂRILOR DE BIOCHIMIE

1. *Sur le mécanisme de l'hyperglicémie initiale de l'insuline*, C.R. Soc. Biol., 102, 107, 1929 (în colab. cu prof. D. Ionescu).
2. *Sur l'affinité de l'hémoglobine pour l'O_2 dans quelques cas d'anémie*, C.R. Soc. Biol., 101, 220, 1929 (în colab. cu dr. Litarczeck și Aubert).
3. *Des facteurs qui peuvent influencer l'affinité de l'hémoglobine pour l'O_2: le pH plasmatique*, C. R. Soc. Biol., 106, 740, 1931 (în colab. cu dr. Litarczeck și Aubert).
4. *Des facteurs qui peuvent influencer l'affinité de l'hémoglobine pour l'O_2: les facteurs intraglobulaires*, C.R. Soc. Biol., 107, 973, 1931 (în colab. cu dr. Litarczeck și Aubert).
5. *Glutation intraglobulaire et variations de l'affinité de l'hémoglobine pour l'O_2*. C.R. Soc. Biol., 107, 1190, 1931 (în colab. cu dr. Litarczeck și Aubert).
6. *Courbe de dissociation du glutathion réduit du sang total*, C.R. Soc. Biol., 108, 343, 1931 (în colab. cu dr. Litarczeck și Aubert).
7. *Courbe de dissociation d'une solution de glutathion dans du sérum sanguin*, C.R. Soc. Biol., 108, 348, 1931 (în colab. cu dr. Litarczeck, Aubert și Comănescu).
8. *L'hyperglicémie provoquée chez le chien normal; étude du sucre libre*, C.R. Soc. Biol., 113, 248, 1933 (în colab. cu prof. Rathery).
9. *L'hyperglicémie provoquée chez le chien normal; étude du sucre protéidique*, C.R. Soc. Biol., 113, 250, 1933 (în colab. cu prof. Rathery).
10. *Rate et métabolisme des glucides*, Congrès de Physiologie, Lille, 1933 (în colab. cu prof Rathery).
11. *La chloruro-cristallisation. Note préliminaire*, Soc. Biol., Bucarest, 1936 (în colab. cu dr. P. Tomescu, F. Șerban, Badenski, Giosanu și Daniel).
12. *Sur le pouvoir glycolitique du sérum sanguin*, Bull. Soc. Biol., 128, 293, 1938 (în colab. cu prof. Rathery și P. M. de Traverse).
13. *L'action précipitante de l'eau distillée sur le sérum sanguin dans différentes affections hépatiques*, Arch. Roum. Path. exp. Microbiol., 15—1/2, 11—24, 1948 (în colab. cu prof. dr. S. Iagnov, M. Saragea și D. Micu).

14. *Cercetări experimentale asupra testului bilirubinemiei directe și indirecte în icterele mecanice*, Com. Acad. R.P.R., Seria șt. med., **I**, *6*, 493—496, 1951 (în colab. cu prof. S. Iagnov, D. Micu și I. Brus).
15. *Considerațiuni asupra valorii bilirubinemiei reziduale în hepatita epidemică*, Prob. terap., *3*, 193—210, 1956 (în colab. cu dr. A. David).
16. *Contribuțiuni la studiul activității succindehidrazei și citocromoxidazei hepatice. Studiu experimental*, Acad. R.P.R., Probl. terap., **VIII**, 13—23, 1957 (în colab. cu M. Zamfirescu-Gheorghiu, F. Kreindler și E. Safirescu).
17. *Valoarea hepato-clinică a testelor de disproteinemie*, Anal. Acad. R.P.R., Seria șt. med., **II**, *19*, 497—615 (1950) (în colab. cu prof. S. Iagnov, M. Saragea, A. Vlad).
18. *Valoarea testului bilirubinemiei pentru explorarea funcțională a ficatului. Cercetări experimentale și clinice. Monografie*, Edit. Acad. R.P.R., București, 1953, 90 p. (în colab. cu prof. S. Iagnov, D. Micu, V. Maximilian).
19. *Proteinemia. Date biochimice, fiziopatologice și clinice*, Edit. Acad. R.P.R., București, 1955, 270 p. (în colab. cu prof. S. Iagnov, F. Kreindler, M. Zamfirescu-Gheorghiu).

B. CINADER (sub red.), *Antibodies to biologically active molecules* (Anticorpii contra moleculelor biologic active), Lucrările celei de-a doua întîlniri a Societății europene de biochimie, Viena, 21—24 aprilie, 1965, Pergamon Press, Symposium Publications Division, Oxford—Londra—Edinburgh—New York—Toronto—Sydney—Paris—Braunschweig, 1967, 424 p.

Prezentul volum suplinește lipsa unei puneri la punct moderne a noilor cunoștințe acumulate în domeniul care a făcut obiectul simpozionului *Anticorpii contra moleculelor biologic active*.

Prin studiul reacției toxină — antitoxină, neutralizarea moleculelor biologic active este o temă veche în imunologie. Simpozionul din 1965 și-a propus să prezinte rezultatele cercetărilor mai noi de neutralizare a altor molecule biologic active, ca proteine, acizi nucleici, enzime, hormoni, virusuri, molecule a căror neutralizare poate fi studiată într-un sistem mai simplu, de numai doi sau trei componenți (antigen-anticorp, substrat). Proteinelor, acizilor nucleici și virusurilor le este consacrat cîte un capitol, hormonilor două, enzimelor patru.

Numele autorilor, specialiști recunoscuți în domeniile respective, asigură valoarea științifică a fiecărui capitol : M. Crumpton pentru proteine ; L. Levi și colab. pentru acizii nucleici ; S.E. Svehag pentru virusuri ; B. Cinader, R. Arnon, J. Uriel și M. Pollock și colab. pentru enzime ; S. Wilson și J. P. Felber și colab. pentru hormoni. O prezentare a cercetărilor moderne asupra reacției toxină-antitoxină este făcută de M. Raynaud în capitolul : „Eterogenitatea anticorpilor antidifterici".

Primul și ultimul capitol (B. Cinader și colab. : „Neutralizarea moleculelor biologic active" și G. Möller și colab. : „Citotoxicitatea imună și stimularea (*enhancement*) imunologică în transplantarea țesuturilor") aduc cîte o prezentare mai vastă a sistemului multicomponent de neutralizare *in vivo*, sistem care implică un număr ridicat de corelații biochimice.

Volumul se încheie cu un capitol scurt, dar deosebit de interesant, datorat lui A. Bussard și intitulat „Perspective", care prezintă cele două direcții de cercetare pentru viitor ale comportării imunologice a substanțelor biologic active. Prima întrebuințează imunologia ca mijloc pentru studiul substanțelor active, iar a doua, în cadrul imunologiei ca disciplină independentă, întrebuințează reacțiile de neutralizare ca mijloc de lărgire a cunoștințelor despre anticorpi.

Este de remarcat foarte bogata bibliografie a fiecărui capitol (100—200 de indicații, cu titlurile articolelor).

Cecilia Motaș
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

Essays in Biochemistry (Eseuri în biochimie), editată de P. N. CAMPBELL, G. D. GREVILLE și publicată pentru Societatea de biochimie de către Academic Press, Londra—New York, vol. 3, 1967, XII + 168 p.

Essays in Biochemistry apare anual cu începere din anul 1965 și publică articole cu caracter de referat general, articole care dau o privire de ansamblu asupra unor probleme actuale ale biochimiei, însă fără o prezentare exhaustivă a literaturii. Sînt schițate linii de cercetare noi ce se desprind din bagajul cunoștințelor existente.

Volumul al 3-lea cuprinde patru eseuri: *Structura imunoglobulinelor* de R.R. Porter, *Bazele acțiunii enzimei* de H. Gutfreund și J.R. Knowles, *Cîteva acțiuni ale hormonilor în reglarea metabolismului glucozei* de C.N. Hales și *Structura și funcția glicoproteinelor* de P.W. Kent.

În primul eseu, R.R. Porter, cel care a imaginat cu zece ani în urmă structura tetracatenară a γ-globulinelor, prezintă într-un stil clar și concis stadiul actual al cunoștințelor asupra structurii imunoglobulinelor la nivel de moleculă, de lanț polipeptidic (secvența aminoacizilor), de zone de combinare și asupra controlului genetic al sintezei lor.

În al doilea eseu, cataliza enzimatică este tratată prin prisma structurii tridimensionale a moleculei proteice. Rolul grupărilor funcționale pe care le poartă proteina și care ar intra în structura zonelor active este exemplificat cu sisteme enzimatice adecvate.

În cel de-al treilea eseu, prezentarea datelor este axată pe rolul insulinei în reglarea metabolismului general, în cazul unui aport de glucoză exogenă. Mecanismul prin care se declanșează secreția insulinei poate fi asemănător procesului de „excitație-contracție" la nivelul mușchiului și de „stimul-secreție" la nivelul glandelor endocrine.

În ultimul eseu, pe baza unei bibliografii bogate, P.W. Kent ordonează cunoștințele în legătură cu structura și funcția glicoproteinelor de origine animală. Studiul acestor macromolecule cu activități biologice importante a cunoscut un progres rapid în ultimii zece ani, datorită dezvoltării unor tehnici noi de lucru, tehnici care sînt incluse în materialul prezentat.

Faptul că în prefață se spune că sugestiile din partea profesorilor și studenților în legătură cu modul de structurare a materialelor sînt bine venite te face să gîndești că *Essays in Biochemistry* se adresează mai ales acestora. Nivelul și modul cum sînt tratate aceste probleme cu caracter mai restrîns fac ca prezentările să fie folositoare tuturor celor care au preocupări în domeniul respectiv.

Silvia Mihăescu
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

P. DENOIX (sub red.), *Mechanisms of invasion in cancer*, vol. 6, U.I.C.C. Monograph Series Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1967, 217 p., 62 fig.

Cel de-al 6-lea volum din seria de monografii apărută sub egida U.I.C.C. conține comunicările și discuțiile purtate la colocviul cu tema *Mecanismele invaziei în cancer*, care a avut loc la Paris, în iulie 1965, sub președinția prof. P. Denoix, completate cu contribuțiile aduse de autori la această temă cu ocazia unei mese rotunde în cadrul Congresului mondial de oncologie de la Tokio din 1966.

Volumul prezintă cercetări ce abordează din diferite unghiuri acest aspect al relațiilor tumoră — gazdă.

Rolul mobilității intrinsece a celulelor tumorale în procesul infiltrativ (Summer Wood), datorită modificării proprietăților membranei celulare și pierderii consecutive a inhibiției de contact (Ambrose), se bucură de o competentă tratare teoretică și constituie punctul de plecare pentru modelul experimental al lui Abercrombie, de apreciere corelată a inhibiției de contact și a capacității invazive.

Interesantă este presupunerea lui M. Stoker privind necesitatea existenței unui volum critic al clonei de celule tumorale, sub care acestea se comportă fenotipic normal.Conform părerii sale, sînt necesare cel puțin 8—16 celule tumorale, pentru ca ele să scape de sub controlul inhibiției de contact.

Pentru observarea modificărilor morfologice, cariologice și de diferențiere funcțională, care însoțesc apariția invazivității, s-a studiat comportamentul celulelor *in vitro* (Barski). S-a

încercat de asemenea să se urmărească mecanismul de invazie pe culturi organotipice, mixte, de țesuturi normale și tumorale, subliniindu-se că, deși căile de infiltrare într-un țesut străin sînt aceleași în ambele cazuri, țesuturile tumorale au și un efect distructiv (Wolff).

În aprecierea invaziei în cancerele umane se introduce ca semnificativă rata de creștere a tumorii, considerînd că aceasta constituie o reflectare a modului de evoluție a relațiilor tumoră-gazdă (P. Denoix).

Diseminarea pe cale circulatorie a celulelor tumorale constituie, după Sträuli și Haemmerli, un moment important în apariția metastazelor, acestea formîndu-se chiar în lumenul vaselor sau fiind fixate de peretele vascular.

Aspectele biochimice ale relațiilor tumoră-gazdă sînt privite atît din punctul de vedere al reacției gazdei — modificări în concentrația de glicoproteine și mucoproteine în ser, sintetizarea de colagen insolubil etc. (Brada) — , cît și din punctul de vedere al acțiunii distructive a tumorii, vizînd acțiunea enzimelor proteolitice și rolul celulelor tumorale capabile de fagocitoză (Sylvén).

În ceea ce privește aspectele imunologice ale relațiilor tumoră-gazdă, sînt prezentate cercetări asupra fenomenului de facilitare imunologică în dezvoltarea tumorilor, cu descrierea naturii și a originii anticorpilor de facilitare, a răspunsului acestor anticorpi la diferiți antigeni celulari, a mecanismului facilitării imunologice (Voisin).

Se prezintă participarea sistemului reticulo-endotelial în reacțiile de apărare contra invaziei tumorale, arătîndu-se că stimularea prealabilă cu diverși agenți bacterieni are ca rezultat creșterea rezistenței față de grefa tumorală.

Este interesantă experiența lui Lacour și colab. privind acțiunea citostatică a antiserului antiribozomal FLS asupra tumorii ascitice FLS de șoarece. Efectul inhibitor asupra creșterii tumorii este însoțit de o inhibiție a biosintezei ARN și proteinelor, probabil în legătură cu participarea ribozomilor la aceste procese.

Școala românească de oncologie este reprezentată de lucrarea prof. O. Costăchel asupra polipasajului tumoral, metodă deosebit de utilă în studiul fenomenelor trofice rapide în reacțiile de transplantare. S-au obținut date privind diferențierea capacității de prindere a grefelor tumorale, obținerea tumorilor resorbabile, creșterea capacității metastazante prin grefarea tumorilor resorbabile etc.

Datorită modului complex în care este abordată problema, volumul realizează o sinteză a punctelor de vedere asupra mecanismului invaziei în cancer.

Liliana Cîrnu
Institutul medico-legal
Laboratorul de genetică moleculară

DAVID GOTTLIEB, PAUL D. SHAW (sub red.), *Antibiotics* (Antibioticele), Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1967.

Lucrarea *Antibioticele* este alcătuită din două volume. Primul volum (785 p.) este consacrat mecanismului de acțiune al antibioticelor, al doilea (466 p.) biosintezei lor.

Publicată cu intenția de a fi un ghid în ajutorul cercetătorului în acest domeniu, lucrarea cuprinde un vast material informativ, incluzînd toate antibioticele asupra cărora s-au făcut investigații pînă în prezent și care exercită diferite categorii de inhibiții : asupra sintezei peretelui celular, funcției membranei, metabolismului ARN și ADN, sintezei purinelor și pirimidinelor, sintezei proteinelor, respirației, fosforilării oxidative.

Fiecare capitol al primului volum conține date referitoare la proveniența, răspîndirea, proprietățile și modul de acțiune al antibioticului respectiv, precum și o bogată bibliografie. Majoritatea datelor prezentate sînt rezultatul experiențelor *in vitro*, cu excepția unui capitol asupra comportării penicilinelor și cefalosporinelor *in vivo*.

Volumul al II-lea cuprinde date asupra condițiilor de producere, asupra precursorilor și intermediarilor intracelulari posibili, precum și asupra căilor metabolice de apariție a diferitelor antibiotice (peniciline și cefalosporine, cloramfenicolul, mitomicine, tetracicline, antibiotice terpenoide, bacitracina, gramicidina, tirocidina, actinomicina, streptomicina, polimixine, neomicine etc.).

Consultarea lucrării este ușurată de existența unui index de subiecte la sfîrșitul fiecărui volum, precum și de o listă în care antibioticele sînt aranjate pe diferite categorii de inhibiție, pe baza informației disponibile asupra locului lor primar de acțiune (vol. I).

Adresîndu-se în primul rînd specialiștilor, această lucrare reprezintă o extrem de utilă punere la punct a bibliografiei în acest domeniu de cercetare, care progresează atît de rapid și care îmbrățișează la ora actuală un spectru atît de larg de ramuri în microbiologie și chimie.

Dita Cotariu
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

R. N. GOODMAN, Z. KIRALY, M. ZAITLIN, *The Biochemistry and Physiology of Infectious Plant Diseases* (Biochimia și fiziologia bolilor infecțioase la plante), D. Van Nostrad Company, Inc., Princeton, N. Jersey, Toronto—Londra—Melbourne, 1967, 355 p.

Deși cercetările referitoare la bazele biochimice și fiziologice ale relațiilor ce se stabilesc între agenții fitopatogeni și plantele parazitate s-au extins mult în ultimii 20 de ani, pînă în prezent nu s-a elaborat o monografie care să trateze această problemă în mod unitar și multilateral. În diferitele tratate de patologie vegetală sînt descrise și discutate doar aspecte ale metabolismului sau patofiziologiei țesuturilor și organismelor atacate de paraziți.

Monografia pe care o prezentăm este prima încercare de tratare a tuturor aspectelor biochimice și fiziologice în interrelațiile lor. Cartea se adresează studenților care se specializează în patologie vegetală și constituie, de fapt, un manual de biochimie și de fiziologie a bolilor plantelor, conceput după datele și punctele de vedere cele mai recente. Pentru o mai bună înțelegere a aspectelor patologice ale acestor procese, autorii descriu la începutul fiecărui capitol datele esențiale biochimice și fiziologice asupra modului normal de desfășurare a proceselor ce urmează a fi tratate. Excepție fac numai primul capitol — „Procesul de infecțiune" —și ultimul — „Toxinele".

Autorii arată în prefață că termenul „infecțios" este folosit doar pentru a diferenția aspectele patologice provocate de virusuri, bacterii și ciuperci, ca agenți infecțioși, de efectele analoge provocate de alți agenți, ca poluanții atmosferei, apa, înghețul, nutriția, insectele, nematozii ș.a., care ar putea constitui, fiecare, subiectul unei monografii de aceleași dimensiuni. Informația bibliografică folosită la redactarea textului este astfel aleasă ca să furnizeze cititorului o imagine cît mai completă și la zi, fără ca totodată să-i supraliciteze atenția cu informații puțin semnificative. Grija autorilor de a ține textul cît mai la zi posibil, în timpul perioadei de redactare și publicare, se oglindește și în faptul că la fiecare capitol, pe lîngă bibliografia citată în text, mai există și o bibliografie necitată, reprezentînd o selecție din lucrările apărute în această perioadă.

Textul a fost redactat de un colectiv de specialişti bine cunoscuţi. Astfel, aspectele privind modificările provocate de bacteriile fitopatogene au fost redactate de R. N. Goodman, profesor de patologie vegetală la Universitatea din Missouri, cele privind ciupercile fitopatogene de Z. Kiraly, şeful laboratorului de biochimie al Institutului de protecţie a plantelor din Budapesta, iar cele privind virusurile fitopatogene de M. Zaitlin, profesor de biochimie agricolă şi patologie vegetală la Universitatea din Arizona.

Fiecare capitol cuprinde o parte finală de analiză comparativă, de integrare, de evidenţiere a aspectelor comune în acţiunea patologică a agenţilor consideraţi, de concluzii generalizatoare asupra specificului procesului patologic, indiferent de agentul patogen, ca şi asupra specificului acţiunii fiecărui patogen.

Primul capitol descrie modul în care procesul infecţios se desfăşoară în cazul fiecărui agent patogen în parte. Se descrie modul de pătrundere, eventualii stimuli ai infecţiei, răspîndirea patogenului în ţesutul atacat, influenţa factorilor interni (stimulatori şi inhibitori naturali) şi externi (lumină, temperatură, nutriţie ş.a.).

Capitolele următoare tratează influenţa agenţilor patogeni asupra proceselor fiziologice sau biochimice, ca : fotosinteza, respiraţia, peretele celular şi procesele metabolice implicate, metabolismul azotului, al fenolilor şi al regulatorilor de creştere. Penultimul capitol tratează problema transportului vascular, iar în ultimul se discută aspectele patologice legate de toxine, fie cele elaborate de patogen, fie cele ce iau naştere în ţesutul infectat, sub influenţa patogenului.

Într-un moment în care, în ciuda bogatului material acumulat şi în continuă creştere în ceea ce priveşte aspectele metabolice şi mecanismele biochimice ale procesului patologic, există tendinţa de a neglija aceste aspecte în tratarea problemei relaţiilor parazit — planta gazdă, această monografie reprezintă o contribuţie cu importanţă nu numai utilitară, ci şi de principiu, o tentativă de a restabili echilibrul just dintre aspectele diferite ale complexului proces patologic.

Claritatea deosebită a textului, iconografia bogată şi sugestivă, condiţiile grafice deosebite fac ca această monografie să poată fi citită cu plăcere şi interes de un cerc larg de studenţi şi specialişti, umplînd un gol de mult resimţit în literatura ştiinţifică.

V. Eşanu
Institutul de biologie al
Academiei Republicii Socialiste România

ERICH KLEIN (sub. red.), *Die pathogenese des diabetes mellitus die endokrine regulation des fettstoffwechsels*, Al 12-lea simpozion al Societăţii germane de endocrinologie, în acelaşi timp cu aniversarea de doi ani a Societăţii germane pentru diabet, Wiesbaden, 21—23 aprilie, 1966, Springer, Berlin—Heidelberg — New York, 1967 XII+377 p., 166 fig.

Volumul grupează lucrările prezentate în trei părţi : I. Patogeneza diabetului zaharat (8 lucrări), urmată de expuneri libere asupra diabetului zaharat (17 lucrări). II. Reglarea endocrină a metabolismului lipidic (7 lucrări), urmată de expuneri libere asupra metabolismului lipidic (6 lucrări). III. Expuneri libere (toate din domeniul endocrinologiei) : suprarenala, hormonii ei, ACTH, glandele sexuale, hormonii sexuali, antiandrogenii (12 lucrări) ; hipofiza şi hormonii hipofizari (6 lucrări) ; tiroida, oftalmopatia endocrină (9 lucrări) ; paratiroida (o lucrare).

După referatul asupra structurii şi sintezei insulinei (Zahn), se relevă faptul că insulina dă reacţii anafilactice, indiferent de origine (animal sau sinteză), care servesc la caracterizarea produsului (Pfeiffer), iar Franckson şi Malaise produc la cobai un ser bogat în anticorpi care inactivează insulina endogenă.

Problema diagnosticului precoce în diabet, mai ales la tineri (Gepts, Renold, Jahnke şi colab.), a fost completată cu sugestii privind modificările unor probe anterior publicate (Dieterle şi colab. ; Kirberger şi colab). În studii clinice s-a arătat relaţia diabetului zaharat cu ciroza (Müting şi colab.), cu ciclul menstrual, şi cu steroizii anabolizanţi (Frericus şi colab.). Experimental s-au studiat : influenţarea secreţiei de insulină prin glucoză, tolbutamidă, ACTH, STH, glucagon, secretină (Telib şi colab.), timpul de înjumătăţire al ^{65}Zn plasmatic (Glaubitt şi colab.) şi toxicitatea tratamentelor îndelungate cu biguanidine (Söling şi colab.).

Privitor la reglarea endocrină a metabolismului lipidic, 7 referate tratează amplu subiectul, sub semnăturile unor personalităţi binecunoscute (Wieland, Westerman, Weinges, Carlson, Jeanrenaud şi Stauffacher, Randle, Schöffling). În cîteva lucrări se studiază influenţarea metabolismului lipidic cu un preparat biguanidinic (Liebermeister şi colab.), cu noradrenalină (Willms şi colab.), efectul luminii (Hollwich şi colab.), al 3,5-dimetilizoxazolului (Schwabe şi Hasselblatt).

Lucrările de endocrinologie încep cu date noi asupra biosintezei steroizilor suprarenali (Oertel şi colab.), urmate de corticoterapia în cîteva boli şi lucrări ce studiază dinamica acestor hormoni şi a ACTH-ului. Studiile experimentale şi clinice, precum şi tehnicile de laborator propuse, contribuie fie la simplificarea metodelor de dozare, fie la perfecţionarea posibilităţilor de diagnostic diferenţial. Relativ la hormonii sexuali feminini, s-au prezentat lucrări de biogeneză (Breuer şi Dahm), determinări în urină (Keiser şi colab.) şi un studiu clinic şi de laborator (Bottermann şi colab.). Hormonii masculini fac obiectul studiilor experimentale (Rindt şi colab.) şi de terapeutică, spre exemplu „deficitul de inteligenţă" (Nowakowski şi colab.), oligospermia (Niermann şi Nolting). Hipofiza şi hormonii săi au făcut obiectul unor cercetări de imunologie (Laschet şi Laschet, Hachmeister), precum şi ale relaţiei gonadotropine — hormoni sexuali (Schmidt-Elmendorf).

Studii despre tiroidă în relaţiile cu hipofiza (von Schweinitz şi Brauns), ca şi cîteva lucrări clinice, printre care este de semnalat tratamentul oftalmopatiei eutireotice (Klein şi Horster), sînt consacrate acestei glande. O metodă de dozare a parathormonului (Lemmer şi colab.) încheie volumul pe care îl considerăm de o valoare deosebită prin noutatea materialului prezentat, indispensabil cercetării, în diabet şi endocrinologie.

Sorin M. Idu
Clinica medicală I.M.F. — Colţea

D. KRITCHEVSKY, R. PAOLETTI, D. STEINBERG (sub red.), *Progress in biochemical pharmacology*, vol. 2 şi 3, *Drugs affecting lipid metabolism*, S. Karger, Basel—New York, 1967.

Volumele 2 şi 3 din colecţia cu titlul de mai sus cuprind lucrările celui de-al doilea simpozion internaţional cu subiectul *Medicamente ce afectează metabolismul lipidic*, organizat în 1965, la Milano, de Societatea europeană de farmacologie biochimică. Lucrările au fost revizuite de autori la sfîrşitul anului 1966.

Partea I (vol. 2) conţine temele : Colesterolul şi ateroscleroza (24 de lucrări) ; Trigliceridele şi lipoproteinele plasmatice (10 lucrări) ; Medicamente ce afectează lipidele plasmatice (22 de lucrări).

XII + 516 pagini, cu 182 de figuri (14 colorate) şi 133 de tabele.

Într-un studiu de sinteză, Holmes şi Di Tullio clasifică hipocolesterolemianţii şi accentuează că unii dintre aceştia opresc biosinteza colesterolului în faze tîrzii ale lanţului metabolic la produşi care se depun în aterom şi dau aceleaşi reacţii chimice ca şi colesterolul. Este nevoie

să se folosească metode de laborator cît mai fine (cromatografie gaz-lichid, în strat subțire etc.) pentru a avea siguranță în aprecierea eficacității medicamentelor.

Metabolismul colesterolului a fost studiat de Dempsey, Dvorak, lanțul izoprenic de Ramsarma și colab., efectul florei intestinale de Carini și colab., influența hormonului tiroidian de Whitehouse și colab. și Kraus și colab. Percy-Robb, ca și Boyd, susțin că tiroidhormonul ar activa eliminarea prin fecale a steroizilor, ca acizi biliari, efect obținut și cu neomicină N-metilată (Van Den Bosch și Claes).

Rolul grăsimilor polinesaturate ca activator al eliminării sterolilor prin fecale este confirmat de Wood și Kinsel, iar Toki și Nakatani atribuie efect hipocolesterolemiant Linolexamidului.

Influențarea coagulabilității sanguine este de asemenea studiată. Szigeti și Jáko dovedesc efectul protector al sfingomielinei. Formarea de trobusuri este atribuită de Constantinides, în primul rînd, fisurilor din pereții vaselor ateroscleroase, iar Utermann și colab. arată că activitatea enzimatică este sporită în ateroscleroză față de normali, contrar impresiei neverificate.

Posibilitatea de tratament pentru normalizarea nivelului trigliceridelor (TG) și lipoproteinelor (LP) este prezentată de Schettler. Rolul hormonilor sexuali a fost cercetat de Furman și colab., Bender și colab., Schejde, Vellis. Verificînd faptul că hidrații de carbon duc la hiperlipemie, Cohen și colab. arată că efectul este mai mic în cazul glucozei. De altfel, Strata și colab. susțin că dereglarea metabolismului glucozei are consecințe mai severe pentru organism decît tulburarea transportului lipidelor. Rolul mucopolizaharidelor în depozitarea lipidelor este dovedit de Gerö și colab., iar Bender și colab. insistă asupra rolului estrogenilor.

În partea referitoare la efectul medicamentelor asupra lipidelor serice, cîteva lucrări sînt consacrate etilclorofenoxiizobutiratului (CPIB sau Clofibrate), comercializat sub numele de Atromid S. În doze zilnice de 1,5—2 g, administrate timp de 1 la 4 ani, preparatul este considerat de Oliver ca cel mai eficient și accesibil azi, cu efect de mobilizare a colesterolului din depozite (Mitchell și colab.). Thropp și Barett, ca și Speake, susțin că eficiența se explică prin competiția pentru acizii grași (AGL) legați de proteine și redistribuirea toxinei endogene în ficat. Rezultatele obținute pe 561 de pacienți au fost publicate în comun de 35 de clinicieni din diverse localități din Anglia. Preparatul a fost eficient și bine tolerat ; s-au semnalat 36 de cazuri (6,4 %) în care tratamentul a trebuit să fie întrerupt. Mortalitatea a fost mai mică decît la martorii netratați.

S-au mai experimentat : substanțe din grupa fenotiazinei (piperazină substituită) de Peeters și Ronsse ; beta-piridincarbinolul (Ronicol) de Zeller ; Zöllner și Gudenzi atribuie aceluiași preparat efect hipocolesterolemiant în cazurile neinfluențate de alimentație. S-a raportat asupra eficienței acidului nicotinic (Merill) și a 6 derivați ai acidului butiric. De reținut afirmațiile lui Balaguer-Vintro și colab., după care unele din medicamentele hipolipemiante scad mai mult trigliceridemia, iar altele colesterolemia, de unde rezultă că mecanismele de acțiune sînt diferite.

Partea a II-a (vol. 3) conține : Acizii grași (4 lucrări) ; Prostaglandine (10 lucrări) ; Metabolismul acizilor grași (AGL) liberi (18 lucrări) ; Transportul acizilor grași liberi (AGL) și al trigliceridelor (TG) (22 de lucrări) ; Vitamine liposolubile (2 lucrări) ; Concluzii.

XII + 528 de pagini cu 183 de figuri și 160 de tabele.

În primul articol, Lynen tratează mecanismul biologic de reglare a acizilor grași, arătînd, printre altele, că restricția de hidrați de carbon scade alfa-glicerofosfatul celular, sporește compușii acid gras-CoA și se inhibă acetil-CoA-cocarboxilazică. Fapte experimentale în completare aduc Tombropoulos, apoi Bally și Diem. Cu privire la metabolismul fosfolipidelor, Porgelláti demonstrează efectul demielinizant al compușilor organofosforici.

Prostaglandinele recent descoperite (1964) în glandele veziculare de oaie și creierul de bovine transformă acizii polienici. Se insistă asupra biosintezei (Samuelsson, Van Dorp) și asupra metabolismului (Hamberg și Samuelsson, Green și colab., Granström). Carlson semnalează efectul hipotensiv, Stock lipoliza, iar Coceani și Wolf, ca și Avanzia și colab., susțin intervenția

în transportul ionilor. Din lucrările autorilor reiese că activitatea prostaglandinelor depinde de tipul şi de originea lor.

Mobilizarea AGL a fost mult studiată în ultimii cinci ani; totuşi, medicamentele introduse în clinică se consideră utile „prea devreme" pentru terapeutica dislipemiei.

Carlson subliniază că acidul nicotinic este hipolipemiant, dar fără influenţă asupra efectului cardiovascular al catecolaminelor şi asupra acţiunii acestora asupra glicemiei. Wing şi colab. dovedesc că, sub acţiunea *clearing factor*-ului din ţesutul adipos epididimal, creşte activitatea enzimatică, dacă mediul conţine glucoză sau fructoză. Adrenalina şi corticotrofina sînt inhibanţi.

După Isselbacher, transportul lipidelor este inhibat de către inhibitorii sintezei proteinelor, deci de transportorii de AGL. Hàines găseşte o sulfolipidă care participă la transportul lipidelor şi face consideraţii asupra permeabilităţii de membrană. Sinteza fosfolipidelor este completată cu date noi de Ansell şi Chojnacki, iar Rizack şi Spencer demonstrează interacţiunea hormonilor în controlul lipolizei din ţesutul adipos.

Nivelul AGL a fost pus în legătură de Siedek şi colab. cu tulburările metabolice din diferite boli, iar Meng şi Ho, ca şi Wenke şi colab., studiază experimental relaţia unor factori care influenţează mobilizarea AGL; de altfel, mai multe lucrări abordează această temă, fie că este vorba de „falşi transmiţători (Westermann şi colab.), fie de „inhibitori" (Burns şi colab.).

S-a studiat influenţa exercitată asupra nivelului sanguin al AGL de beta-piridincarbinol şi acidul nicotinic (Paulet şi colab.); desferrioxamină (Pozza şi colab.); tetrahidropapaverolamină (Fassina şi colab.); medicamente din grupul sulfonil-ureei (Stone şi Brown); ouabaină (Ho şi colab.).

În partea rezervată transportului AGL şi TG s-a studiat efectul acidului nicotinic, salicilaţilor (Bizzi şi Carattini), antioxidanţilor (Luzio). S-au prezentat teme de fiziopatologie clinică şi experimentală: transportul lipidic în dislipemia congenitală (Frederickson şi colab.), metabolismul trigliceridelor hepatice (Heimberg şi colab.), efectul heparinei asupra chilomicronilor marcaţi (Brown), ca şi efectul unor medicamente şi al frigului asupra activităţii lipolitice a cordului (Grafnetter şi Zémplényi).

Influenţa grăsimilor nesaturate asupra scăderii TG serice este considerată variabilă de Engelberg. Brunaud şi colab. relevă efectul clarifiant al sulfatului de xilan la animal. Persson şi colab., bazaţi pe observaţia că la om, o dată cu creşterea AGL, se inhibă glicoliza, concomitent cu creşterea insulinemiei, afirmă că s-a creat nesiguranţă în interpretarea mecanismului metabolic.

După Solyom şi Pugliesi, acidul nicotinic influenţează favorabil sinteza TG şi transportul AGL prin acţiunea sa inhibitoare asupra ficatului. În ce priveşte hiper-TG-emia indusă de alcool, aceasta se petrece sub control hormonal (steroizi şi catecolamine), după Marjorie şi colab. şi Ammon şi Zeller, care au demonstrat efectul protector al beta-piridincarbinolului în ficatul gras, în intoxicaţii medicamentoase, cu CCl_4 ş.a. (Recknagel şi Ghosal). Clortetraciclinele duc la ficat gras prin blocarea secreţiei de TG în plasmă şi a oxidării AGL (Vavrecka şi colab.).

Relativ la dismetabolia obezităţii, Strata şi colab. ajung la concluzia că răspunsul la epinefrină nu poate deosebi tipul „simplu" sau „metabolic" de obezitate, indicat de Mayer. Studiul mobilizării grăsimilor la obezi, pe 5 cazuri, este făcut de Turpini în lumina datelor actuale.

Metabolismul beta-carotenului şi vitaminei A (Goodman) şi cercetări privind grupul vitaminei D_2 prin cromatografie gaz-lichid (Nair şi De Leon) completează volumul.

Concluziile simpozionului, formulate de Sinclair (Oxford) într-un stil plin de umor, rezumă în 6 pagini cunoştinţele actuale desprinse din lucrările simpozionului. Se arată progresele făcute în cei cinci ani care s-au scurs de la primul simpozion, dar se accentuează că tema propusă este departe de a fi rezolvată. Lucrările prezentate sînt doar un imbold pentru a începe altele, pentru a continua lucrul.

Sorin M. Idu
Clinica medicală I.M.F. — Colţea

J. H. BURCHENAL, D. P. BURKITT (sub red.), *Treatment of Burkitt's Tumour* (Tratamentul tumorii lui Burkitt), vol. 8, Proceedings of a Conference organized by the Chemotherapy Panel of the International Union Against Cancer, U.I.C.C., Monograph Series, Springer, Berlin—Heidelberg—New York, 1967, 268 p.

În luna ianuarie 1966 a avut loc la Kampala (Uganda) o conferință internațională dedicată chimioterapiei tumorii lui Burkitt, la care au participat 33 de specialiști din 12 țări. Materialele prezentate în cadrul acestei conferințe au fost înmănunchеate într-o monografie, publicată recent prin grija Uniunii internaționale contra cancerului.

Tumora lui Burkitt apare mai frecvent la copiii din Africa, dar a fost întîlnită și în Noua Guinee, Brazilia, Columbia, India și Statele Unite, avînd trăsături comune cu leucemia acută. Studii de patologie geografică au arătat că incidența anumitor tumori variază în diferite arii geografice, ceea ce ar indica influența mediului înconjurător sau a unor factori genetici. În această direcție, cercetările de chimioterapie geografică pot contribui la lămurirea acestor probleme prin determinarea acelor tumori cu apariție patologică similară, din diferite țări, care răspund asemănător tratamentului chimioterapic. Astfel, dacă rezultatele nu sînt identice, înseamnă că există o acțiune a mediului înconjurător sau a factorilor genetici.

În acest sens, monografia de față prezintă o serie de comunicări care, în afara constatărilor epidemiologice, clinice și terapice, cuprind și cercetări de tip imunologic, în care s-au evidențiat anticorpi ce reacționează *in vitro* cu celulele tumorale.

Rezultatele lucrărilor publicate în această monografie prezintă interes pentru stabilirea unei terapii adecvate și efective nu numai pentru tumora lui Burkitt, dar și pentru cazurile de leucemie acută.

Corina Iordache
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

P. N. CAMPBELL, *The structure and function of animal cell components. An introductory text.* (Structura și funcțiile componentelor celulei animale. Text introductiv). Pergamon. Press, New York, 1966, 148 p. cu un index.

Apărută în 1966, sub semnătura unuia dintre cei mai cunoscuți specialiști din domeniul biochimiei celulare, această carte încearcă să coreleze cercetările actuale de biochimie și biologie moleculară cu concepțiile moderne asupra structurii celulelor animale. Așa cum este de altfel subintitulată, ea este un text introductiv. În cele 148 de pagini, împărțite în șase capitole, nu se face decît o introducere în subiectul, foarte vast, care este structura și funcțiile celulei.

În primul capitol se descriu funcțiile fiziologice și biochimice ale celulei, ca și structura ei, așa cum este revelată de microscopia electronică. În continuare, autorul trece în revistă metodele de cercetare care permit stabilirea unor corelații între structura celulei și funcțiile acesteia. Aceste metode sînt împărțite în trei categorii : metode de comparare a structurii celulelor cu funcții diferite, metode citochimice și metode care implică distrugerea celulei și separarea componentelor sale.

Capitolul al 2-lea este consacrat mitocondriilor. După prezentarea caracterelor lor generale, a răspîndirii și dinamicii acestor organite celulare, sînt descrise funcțiile lor, evidențiindu-se rolul mitocondriilor în sinteza ATP-ului prin cuplarea glicolizei și a ciclului acizilor tricarboxilici cu lanțul respirator. De asemenea sînt prezentate rezultatele unor cercetări recente în legătură cu structura mitocondriei, ca și cu raportul dintre structură și funcție la nivelul acestui organit celular.

În capitolul următor este descris rolul reticulului endoplasmatic şi al ribozomilor în biosinteza proteinelor, dîndu-se şi o schemă a etapelor acestui proces.

Nucleul — alcătuirea sa morfologică, compoziţia chimică, proteinele nucleare, aspectele biochimice şi morfologice ale metabolismului acizilor nucleici, ca şi alte activităţi metabolice ale nucleului — constituie obiectul capitolului al 4-lea.

Sînt descrişi apoi lizozomii şi rolul acestora în tractul digestiv intracelular.

În ultimul capitol, autorul trasează, din perspectiva cunoştinţelor actuale, cîteva direcţii posibile de cercetare pentru viitor.

Fiecare capitol are o listă bibliografică, în care sînt citate atît lucrările folosite nemijlocit de autor în capitolul respectiv, cît şi alte lucrări, de importanţă majoră în domeniul prezentat.

Cartea se distinge prin actualitatea ei (cele mai multe din lucrările citate sînt publicate în 1965), printr-un bogat material ilustrativ, prin stilul concis şi metodic de prezentare a unui vast şi variat volum de date ştiinţifice

Constanţa Muşolan
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

H. SIMON, H. G. FLOSS, *Anwendung von Isotopen in der Organischen Chemie und Biochemie* (Folosirea izotopilor în chimia organică şi biochimie), vol. I: *Bestimmung der Isotopenverteilung in markierten Verbindungen* (Determinarea repartiţiei izotopilor în combinaţiile marcate), Springer, Berlin—Heidelberg—New York, 1967, 247 p.

Izotopii au găsit o aplicaţie tot mai largă în chimia organică şi biochimie, mai ales la lămurirea mecanismelor reacţiilor organice şi de biosinteză. A lipsit însă pînă în prezent o lucrare care să adune şi să prezinte în detaliu metodele cu care se pot obţine rezultate exacte cu privire la repartiţia izotopilor în diferitele poziţii ale moleculelor. Rezultatul cercetărilor de acest fel depinde, într-o mare măsură, de efectuarea ireproşabilă a degradărilor chimice şi enzimatice. Prezenta lucrare vine să completeze această lacună de mult resimţită. Scopul lucrării este de a da cercetătorului metode amănunţite de lucru, împărţite pe clase de compuşi, şi de a atrage atenţia asupra diferitelor subtilităţi şi surse de erori întîlnite la efectuarea reacţiilor de degradare.

După ce în capitolul 1 se dau o serie de generalităţi privitoare la metodele fizice de determinare a repartiţiei izotopilor, la reacţiile chimice de degradare, degradarea combinaţiilor marcate cu carbon şi hidrogen, degradarea stereospecifică, fragmentele mai importante rezultate din reacţiile de degradare şi izolarea lor etc., autorii trec în capitolul al 2-lea, la prezentarea metodelor concrete de lucru, cu exemplificări de degradare din domeniul acizilor organici. Acest capitol are o importanţă deosebită şi prin faptul că la degradarea combinaţiilor organice se folosesc foarte des reacţii de oxidare ce duc, de obicei, la acizi carboxilici, care apoi sînt degradaţi mai departe.

Capitolul al 3-lea este consacrat hidrocarburilor alifatice, capitolul al 4-lea alcoolilor, aminelor şi derivaţilor halogenaţi, iar capitolul al 5-lea aldehidelor şi cetonelor. Numeroasele metode de degradare chimică sau microbiologică ale unor compuşi cu mare rol biologic, cum sînt hidraţii de carbon şi derivaţii lor, formează obiectul capitolului al 6-lea. Cu degradarea ciclurilor aromatice se ocupă capitolul al 7-lea, iar capitolul al 8-lea cu combinaţiile cicloalifatice, izoprenoizi şi steroizi. Capitolul al 9-lea cuprinde metodele de degradare folosite în cazul combinaţiilor heterociclice, cu azot, sulf sau oxigen. Ultimul capitol este dedicat metodelor de degradare folosite în cazul unor combinaţii mai speciale întîlnite în natură, cum sînt vitaminele, coenzimele, alcaloizii, produşii metabolici ai mucegaiurilor ş.a.

Materialul cuprins în acest volum este bine sistematizat şi prezentat într-o formă concisă şi clară. El a fost adunat dintr-o vastă literatură de specialitate (peste 800 de trimiteri bibliografice), consultîndu-se lucrările apărute pînă în anul 1966.

O tabelă foarte utilă cuprinde formula brută a tuturor compuşilor amintiţi în carte, denumirea lor, metoda de degradare folosită şi trimiterea bibliografică. Un index alfabetic pe subiecte şi numeroasele scheme de degradare vin, de asemenea, în ajutorul cercetătorului care lucrează în acest domeniu.

Horst D. Schell
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

H. DETERMANN, *Gelchromatographie. Gelfiltration, Gelpermeation, Molekülsiebe. Ein Laboratoriumsbuch mit 40 Abbildungen* (Cromatografia în gel. Gel-filtrare, gel-excludere, site moleculare. O carte de laborator cu 40 de figuri), Springer, Berlin—Heidelberg—New York, 1967, 204 p., cu 40 fig. şi 60 de tabele şi scheme.

Cromatografia în gel a luat într-un timp relativ scurt o extindere rareori întîlnită la alte metode de laborator. Gama produşilor care pot fi izolaţi, purificaţi şi analizaţi cu ajutorul acestei metode se întinde de la virusuri, proteine, hidraţi de carbon, acizi nucleici cu componentele lor, peste hormoni, antibiotice şi lipide, pînă la polimerii înalţi sintetici. Cartea, scrisă de un expert în acest domeniu, care a participat activ la dezvoltarea acestei metode, prezintă, într-o formă concisă şi deosebit de documentată, bazele teoretice şi aspectele practice ale cromatografiei în gel, cu posibilităţile ei numeroase de aplicare.

După un capitol introductiv, în care se expun principiile de separare a substanţelor pe baza diferenţelor existente între greutăţile lor moleculare, în capitolul al 2-lea se discută pe larg practica cromatografiei în gel. În acest capitol sînt prezentate mai întîi metodele de preparare şi proprietăţile gelurilor hidrofile (cum sînt cele pe bază de dextran, poliacrilamidă, agar, agaroză) şi ale gelurilor organofile (acrilice, polistirenice, aerogeluri şi de tip Sephadex). Apoi, după prezentarea şi a gelurilor întîlnite în comerţ, se trece la descrierea diferitelor dispozitive folosite în această tehnică (coloane, colectoare de fracţiuni ş.a.), arătîndu-se principiul lor de funcţionare, modalitatea asamblării lor etc. Acest capitol se încheie cu o parte privitoare la cromatografia în gel în strat subţire.

Capitolul al 3-lea este consacrat bazelor teoretice ale cromatografiei în gel, iar capitolul al 4-lea diferitelor aplicaţii ale acestei metode, dintre care amintim : gel-filtrarea, cromatografia în gel, determinarea greutăţilor moleculare, cercetarea sistemelor polidisperse, separarea nebazată pe diferenţe în greutatea moleculară.

Ultimul capitol cuprinde, într-o formă deosebit de bine sistematizată, rezultatele obţinute cu ajutorul cromatografiei în gel în cele mai diferite domenii, ca, de pildă, în enzimologie, în endocrinologie, în chimia proteinelor plasmatice, în determinarea structurii proteinelor, în chimia acizilor nucleici şi a hidraţilor de carbon, în chimia clinică etc.

Această carte, deosebit de utilă din punct de vedere practic şi teoretic, cuprinde după fiecare capitol un bogat material bibliografic, iar la sfîrşit un index alfabetic pe subiecte şi un index de autori, care completează în mod fericit cele prezentate în text.

Horst D. Schell
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

D. SHUGAR (sub. red.), *Genetic Elements — Properties and Function* (Elemente de genetică. Proprietăţi şi funcţii), Academic Press, Londra—New York; PWN-Polish Scientific Publishers, Varşovia, 1967.

Volumul, apărut sub îngrijirea prof. D. Shugar, conţine lucrările simpozionului de acizi nucleici, ţinut cu ocazia celui de-al treilea Congres al Federaţiei europene de biochimie (FEBS), organizat la 4—7 aprilie, la Varşovia, de către Societatea de biochimie din Polonia.

Lucrările sînt selectate pe trei secţiuni, şi anume: elemente de genetică, codul genetic şi secvenţa nucleotidelor în ARN.

În prima secţiune sînt tratate o serie de subiecte actuale ale biologiei moleculare, ca: structura moleculară a acizilor nucleici, locurile active din ARN, ADN-ul mitocondrial şi alte forme citoplasmatice de ADN, replicarea polideoxinucleotidelor şi a ARN viral, mecanismul de formare a legăturii peptidice în sinteza proteinelor şi altele.

Secţiunea următoare se referă la progresele realizate în cunoaşterea codului genetic, prin utilizarea atît a polinucleotidelor cu secvenţă nucleotidică bine definită (obţinute prin sinteză chimică sau enzimatică), cît şi a unor sisteme biologice acelulare, adecvate unor astfel de cercetări.

Ultima secţiune a cărţii cuprinde lucrările referitoare la secvenţa nucleotidelor în ARN. Sînt prezentate rezultatele privind structura primară a ARN de transfer, reconstituirea parţială a moleculei de ARN de transfer al valinei, fracţionarea nucleotidelor radioactive şi proprietăţile şi funcţiile ARN de transfer al fenilalaninei, deficitar în metil.

În general, toate lucrările din cele trei secţiuni depăşesc cadrul unor comunicări obişnuite. Pe lîngă faptul că aduc rezultate experimentale şi interpretări originale, autorii fiind în general nume bine cunoscute în domeniul biologiei moleculare, multe din lucrările cuprinse în volum constituie atît scurte puneri la punct în domeniile respective, cît şi puncte de plecare pentru cercetări viitoare.

Fiecare articol este însoţit de indicaţii bibliografice, precum şi de discuţiile generate în cadrul simpozionului, iar volumul cuprinde un amplu index de autori şi de subiecte.

Utilă specialiştilor care studiază structura acizilor nucleici, codul genetic sau mecanismul de biosinteză al proteinelor, cartea depăşeşte totuşi cadrul mai restrîns al specialiştilor, fiind de un deosebit interes pentru toţi cei care se preocupă de progresele actuale în domeniul biologiei contemporane.

S. Vasu
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

ȘEDINȚE DE COMUNICĂRI

organizate de Comisia și Subcomisiile de biochimie ale Academiei Republicii Socialiste România

În ziua de 11.XII.1967 a avut loc ședința de comunicări a Comisiei de biochimie cu următoarea ordine de zi :

1. Marcela Zamfirescu : *Viața și opera dr. I. Cosmulescu.*
2. Izabela Potop : *Contribuția școlii românești la biochimia endocrină.*
3. Marcela Zamfirescu : *Utilitatea metodelor izoenzimatice în diagnosticul clinic.*
4. Nela Mison-Crighel : *Informare asupra primului Congres internațional de neurochimie (Strasbourg, iulie, 1967).*

În ziua de 28.XII.1967 a avut loc ședința de comunicări a Subcomisiei de biochimie de la Iași cu următoarea ordine de zi :

1. C. Pintea : *Ipoteza inedită a prof. H. Vasiliu cu privire la structura substanțelor proteice în lumina concepțiilor actuale.*
2. V. Artenie : *Purificarea parțială și studiul unor proprietăți ale colinacetiltransferazei.*
3. S. Zinca, V. Zinca și L. Badea : *Transmiterea efectelor estrogene prin intermediul ARN-ului macromolecular vaginal.*

* * * *Congresul internațional de biochimie de la Tokio.*

În ziua de 8.XII.1967 a avut loc ședința de comunicări a Subcomisiei de biochimie de la Timișoara cu următoarea ordine de zi :

1. M. Vanghelovici, C. Bilegan, N. Haffner și V. Vanghelovici :

Cercetări în biochimia ateromatozei experimentale. II. Contribuțiuni la studiul metabolismului glutationului și al acidului glucuronic în ateromatoza experimentală.

2. T.B. Gîrda, E. Catrina, T. Popa, M. Miloș, A. Contrea și R. Tribunescu : *Contribuții la cunoașterea valorilor raporturilor Ca/P, Ca/Na și K/Na în fînurile unor leguminoase și variația valorii acestor raporturi în fînurile de lucernă în funcție de faza fenologică și epoca de recoltare.*

3. P. L. Mureșan, Ghizela Czeizler, F. Petreanu și M. Samail :

Contribuții la cunoașterea valorii biologice a cîtorva produse vegetale, pe baza de compoziție chimică, aminoacizi și componenta minerală.

În ziua de 7. XII.1967 a avut loc ședința de comunicări a Subcomisiei de biochimie de la Tîrgu-Mureș cu următoarea ordine de zi :

1. F. Mody, V. Szegö, E.S. Marer, I. Tatar, L. Kelemen : *Aspecte imunoelectroforetice în hepatopatiile cronice.*
2. I. Hirschfeld, G. Fodor, A. Laszló și A. Abraham : *Includerea ^{75}Se selenometioninei în diferite organe.*
3. I. Hirschfeld, A. Kovacs, A. Laszló și V. Geangalău : *Includerea metioninei—^{35}S în diferite organe în cursul intoxicației acute.*
4. I. Hirschfeld, A. Kovacs, A. Laszló și A. Iazigian : *Includerea metioninei—^{35}S în diferite organe în cursul intoxicației cronice.*

5. E. Kifor : *Unele probleme privind modificarea activității enzimelor lizozomiale în cursul procesului de degranulare.*

6. E. Kifor, E. Kótay-Lakatos, G. Malnasi, O. Kifor și M. Vertan : *Studiul corelației dintre activitatea proteazelor neutre din plasma sanguină și numărul granulocitelor eozinofile circulante.*

La 31 mai 1968 se va ține la Leipzig cel de-al II-lea Simpozion internațional de industrie fermentativă. Cei interesați pot lua informații de la : „Forschungsinstitut für die Gärungsindustrie, Enzymologie und technische Mikrobiologie der Deutschen Demokratische Republik., 1017 Berlin, Alt Stralau 62.

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : Viaţa ştiinţifică, în care, prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. Recenzii — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele schimbul de publicaţii etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 2, Sectorul I.

1968 JUN 25

LUCRĂRI APĂRUTE IN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii ribonucleici celulari şi virali**, 1966, 25×17,50, 375 p., 8 pl., legat, anvelopă, 26 lei.

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţa şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie**, 1966, 25×17,50, 285 p., 18 pl., legat, anvelopă, 27 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese. Œuvres choisies**, 1965, 25×17,50, 687 p., legat, anvelopă, 44 lei.

* * * **Omagiu acad. prof. RALUCA RIPAN**, 1966, 30,50×21,50, 628 p. + 2 pl., legat, anvelopă, 50 lei.

La revue „Studii şi cercetări de biochimie" paraît 4 fois par an. Le prix d'un abonnement annuel est de $ 5. — FF. 25. — DM. 20. — Toute commande à l'étranger sera adressée à CARTIMEX, Boîte postale 134-135 Bucarest, Roumanie ou à ses représentants à l'étranger". En Roumanie, vous pourrez vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM. TOMUL 11, NR. 2, P. 101—208, BUCUREŞTI, MAI 1968

I. P. „Informaţia" — c. 5233

43816

Lei 12.—

F 1330

studii şi cercetări de biochimie

3

TOMUL 11
1968

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
St. cerc. biochim., tomul 11, nr. 3, p. 209—326, Bucureşti, 1968

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU, VICTORIA ALEXANDRESCU.

Secretar de redacție:

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 48 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se fac prin CARTIMEX, Căsuța poștală 134–135, București, Republica Socialistă România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie".

ADRESA REDACȚIEI:

București, Str. Docenților nr. 20
Sectorul 1

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tomul. 11, 1968 Nr. 3

SUMAR

Pag.

E. MACOVSCHI, Teoria biostructurii şi problema transportului activ al ionilor de sodiu în axonii giganţi de *Sepia* 213

V. ALEXANDRESCU, Raportul antigenic dintre proteinele solubile din axul embrionar al seminţei şi alte formaţiuni şi organe ale porumbului. . . 233

V. ALEXANDRESCU, I. CĂLIN, Comportarea electroforetică şi imunoelectroforetică a proteinelor din axul embrionar al seminţei de porumb după germinaţie 239

L. BOTOŞĂNEANU, Izoperoxidazele din mazăre (*Pisum sativum*) în cursul germinaţiei 247

A. CSONTOS, Modificarea structurii catalazei sanguine prin inhibiţia ei cu cianură de sodiu 255

M. FURNICĂ, Caracterizare spectrofotometrică a ADN după iradiere *in vivo*. IV. Acţiunea dezoxiribonucleazei asupra ADN extras de la animale normale sau iradiate. 261

A. GHEORGHIU, E. IONESCU-MATIU, Cercetări asupra sapogeninelor steroidice. Prezenţa clorogeninei în plantal *Tribulus terrestris* L.. 269

S. M. IDU, L. COCIUMIAN, Folosirea soluţiilor de săruri de cobalt[II] ca etalon la dozarea acidului 4-hidroxi-3-metoxi-mandelic urinar 275

S. MIHĂESCU, Fluorocromarea distructivă a anticorpilor. 281

G. NEAMŢU, C. BODEA, Contribuţii la biosinteza carotinoidelor. II. Biosinteza carotinoidelor din *Aglaonema commutatum* Schort 287

L. POPA, Influenţa naturii şi concentraţiei alimentului azotat asupra mersului fermentaţiei butirice 295

L. SCOLNIC, Exosmoza substanţelor reducătoare din muşchiul gastrocnemian de broască în diferite condiţii experimentale 305

D. TĂNĂSESCU, N. MOLDOVEANU, Electroforeza proteinelor sarcoplasmatice musculare în gel de poliacrilamidă 313

RECENZII 321

St. cerc. biochim., tomul 11, nr. 3, p. 209—326, Bucureşti, august 1968

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tomul 11 (1968) Nr. 3

CONTENTS

E. MACOVSCHI, Biostructure theory and problem of sodium ions active transport in giant axons from Sepia 213

V. ALEXANDRESCU, Antigenic connections between soluble proteins of the seed embryonic axis and other parts and organs of maize 233

V. ALEXANDRESCU, I. CĂLIN, Electrophoretic and immunoelectrophoretic behaviour of proteins of the embryonic axis of the maize seed after germination 239

L. BOTOŞĂNEANU, Pea (*Pisum sativum*) iso-enzymes during germination. . 247

A. CSONTOS, Modification of blood catalase structure at its inhibition with sodium cyanide 255

M. FURNICĂ, DNA spectrophotometric characterization after *in vivo* irradiation. IV. The deoxyribonuclease action on DNA extracted from normal or irradiated animals 261

A. GHEORGHIU, E. IONESCU-MATIU, Investigations on the steroid sapogenins. The presence of chlorogenin in the *Tribulus terrestris* L. plant. . . 269

S. M. IDU, L. COCIUMIAN, The use of Cobalt II salts as standards in the determination of 4-hydroxy-3-methoxy-mandelic acid in urine. 275

S. MIHĂESCU, Antibodies inactivation by fluorescent labelling. 281

G. NEAMŢU, C. BODEA, Contributions to carotenoids biosynthesis. II. On the carotenoids biosynthesis from *Aglaonema commutatum* Schort 287

L. POPA, Influence of nature and concentration of the nitrogenous nutrient on the butyric fermentation process 295

L. SCOLNIC, Diffusion of reductive substances of the frog gastrocnemius muscle under different experimental conditions 305

D. TĂNĂSESCU, N. MOLDOVEANU, Electrophoresis in polyacrylamide gels of muscle sarcoplasmic proteins 313

BOOK REVIEWS. 321

St. cerc. biochim., tomul 11, nr. 3, p. 209–326, Bucureşti, august 1968

ST. CERC. BIOCHIM. 11, 3, 213–232 (1968)

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA KÖNYVTÁRA DOKUMENTÁCIÓS OSZTÁLYA

TEORIA BIOSTRUCTURII ŞI PROBLEMA TRANSPORTULUI ACTIV AL IONILOR DE SODIU ÎN AXONII GIGANŢI DE *SEPIA*

Acad. E. MACOVSCHI

Rezumat – Teoria biostructurii permite o nouă interpretare a datelor experimentale obţinute de A. L. Hodgkin şi R. D. Keynes cu privire la efluxul ionilor de sodiu din axonii giganţi de Sepia încărcaţi cu sodiu radioactiv şi cufundaţi în apa de mare.

Conform acestei interpretări efluxul menţionat este un fenomen de difuzie, care se produce conform gradientului de concentraţie a ionilor de sodiu dintre axoplasma şi apa de mare, şi nu este un fenomen de pompare a sodiului contra acestui gradient.

Interpretarea de mai sus se bazează pe o serie de consideraţii în legătură cu postulatele teoriei membranei şi teoriei biostructurii, cu mecanismul de încărcare a axonilor cu ionii de sodiu radioactiv şi cu mecanismul efluxului ionilor de sodiu din axon.

Rezultatele obţinute sugerează noi probleme de cercetare în domeniul biochimismului celular şi al electrofiziologiei.

În ultimii ani am elaborat o nouă concepţie despre alcătuirea viului, profund deosebită de concepţia moleculară, care domină biologia actuală [1], [2]. Conform acestei concepţii, o parte din materia cuprinsă în celulele vii este integrată într-o structură cu totul specială, care se destramă o dată cu moartea, punînd în libertate componentele din care este alcătuită. Această structură se deosebeşte fundamental de orice structură pe care o poate forma materia nevie; moleculele diferitelor substanţe integrîndu-se în ea şi devenind componentele ei, îşi modifică comportarea şi prezintă însuşiri noi pe care nu le-au avut înainte de integrare; legăturile corelative care se stabilesc între componentele acestei structuri fac ca ea să apară ca un „întreg", în care o modificare provocată la nivelul uneia dintre componente influenţează alte componente şi se repercutează fie asupra unei porţiuni, fie asupra întregii structuri.

Structura menţionată poate fi numită *biostructură*, materia cuprinsă în ea — *materie vie*, iar concepţia despre acest mod particular de alcătuire a materiei vii — *concepţia biostructurală*.

După concepţia noastră, materia din organismele vii se prezintă sub două aspecte coexistente : cel biostructural, specific viului (materia vie) şi cel molecular, specific neviului (materia nevie), pe cînd în organismele moarte întreaga materie se prezintă sub un singur aspect, cel molecular, specific materiei nevii.

De la concepția biostructurală se ajunge la o nouă teorie a permeabilității celulare — teoria biostructurii —, după care rolul principal în fenomenele de schimb dintre celulele vii și mediu îl are materia vie [3]; prin acest postulat, teoria biostructurii se deosebește fundamental de actuala teorie a membranei, după care rolul principal în schimbul menționat revine membranelor celulare.

Pentru a verifica aplicabilitatea teoriei biostructurii și a arăta avantajele ei față de teoria membranei, am analizat prin prisma ei datele experimentale obținute de K. Mond și R. Amson în 1928 [4], cu privire la repartiția ionilor de potasiu și clor între mușchii trenului posterior de broască și lichide de perfuzie de compoziție diferită. Rezultatul a fost pozitiv [5].

Acum, pentru a scoate și mai bine în evidență deosebirile dintre teoria biostructurii și aceea a membranei, am trecut la reexaminarea lucrărilor experimentale aduse direct în sprijinul teoriei membranei și, în acest scop, am luat în considerare lucrarea publicată de A. L. Hodgkin și R. D. Keynes [6] în 1955, citată în multe cărți și tratate de fiziologie [7], [8], [9]. În această lucrare, autorii au cercetat schimburile ionice dintre axonii giganți ai unor animale marine și apa de mare, căutînd să demonstreze existența unei „pompe de sodiu" localizate în membranele celulelor vii. Conform teoriei membranei, această pompă expulzează fără întrerupere ionii de sodiu din celule, contra gradientului de concentrație și prin acest „eflux activ" mențin în celulele vii o concentrație de ioni de sodiu cu mult mai mică decît cea din mediul exterior, deși, datorită permeabilității membranelor celulare pentru electroliți, ionii de sodiu din mediul înconjurător pătrund continuu în celule.

După teoria biostructurii, pompa de sodiu nu există [3]. De aceea, examinate de pe pozițiile teoriei biostructurii, rezultatele experimentale obținute de A. L. Hodgkin și R. D. Keynes trebuie să aibe o altă semnificație decît aceea care le-a fost atribuită pînă acum și trebuie să indice manifestarea altor fenomene, supuse altor legi decît cele indicate de teoria membranei.

Cum datele din lucrarea menționată a lui A. L. Hodgkin și R. D. Keynes sînt numeroase și privesc diferite aspecte ale schimburilor ionice dintre axoni și apa de mare, ne vom referi deocamdată numai la schimburile ionilor de sodiu, urmînd ca analiza aspectelor care privesc acțiunea inhibitorilor metabolici asupra acestui schimb, precum și problema schimbului ionilor de potasiu, să facă obiectul altor lucrări.

Cercetările au fost efectuate pe „axonii neramificați de *Sepia officinalis* cu diametrul de 160—300 μ și 40—60 mm lungime. Toate fibrele erau curățite cu grije de țesuturile aderente, în așa fel încît în urmă să rămînă cîte 15 mm axon intact de fiecare parte a porțiunii folosite pentru măsurători" [6]. O dată preparați, axonii se introduceau într-o apă de mare artificială ce conținea ioni de sodiu radioactiv (Na^{24}) și se stimulau cu ajutorul unui curent electric alternativ. Aceasta permitea pătrunderea în axoni a unei cantități relativ mari de sodiu radioactiv. Apoi, axonii încărcați cu sodiu se introduceau în apă de mare obișnuită sau într-o soluție de o anumită compoziție, iar efluxul sodiului radioactiv din axoni se urmărea prin măsurarea periodică a radioactivității apei de mare, respectiv a soluției folosite. Scopul lucrării a fost de a verifica dacă există într-adevăr

un „eflux activ" de sodiu, îndreptat împotriva gradientului de concentrație, deoarece un astfel de eflux ar constitui un argument în favoarea existenței pompei de sodiu în membranele axonilor vii.

Pentru a ușura compararea explicațiilor și concluziilor date de A. L. Hodgkin și R. D. Keynes în urma examinării rezultatelor lor experimentale prin prisma teoriei membranei, cu explicațiile și concluziile la care ajungem examinînd aceleași rezultate experimentale prin prisma teoriei biostructurii, vom prezenta întîi postulatele celor două teorii și apoi vom trece la analiza comparativă a acelor părți ale lucrării lor care se referă la schimburile ionilor de sodiu între axoni și apa de mare.

1. POSTULATELE TEORIEI MEMBRANEI ȘI ALE TEORIEI BIOSTRUCTURII

Teoria memoranei

Teoria membranei admite că protoplasma este o soluție apoasă (lichid protoplasmatic) (postulatul 1.1); că apa protoplasmei este liberă și nu se deosebește, ca stare și însușiri, de apa obișnuită (postulatul 1.2), că electroliții sînt dizolvați integral în apa protoplasmei și disociați în ioni (postulatul 1.3.) și că factorul principal care determină asimetria distribuției electroliților între protoplasmă (lichidul intracelular) și lichidul interstițial (extracelular) este membrana electrică celulară care învăluie protoplasma (postulatul 1.4.) [3].

În aceste condiții, raportul dintre cantitatea totală a unei specii de ioni din protoplasmă și cantitatea totală a apei din protoplasmă reprezintă concentrația ionilor respectivi în lichidul protoplasmatic, adică în celula vie.

Teoria biostructurii

Teoria biostructurii admite că protoplasma este un ansamblu alcătuit din materie vie și materie nevie (ansamblul protoplasmatic) (postulatul 3.1.); că numai o parte din apa protoplasmei, și anume aceea care revine materiei nevii, este liberă și nu se deosebește, ca stare și însușiri, de apa obișnuită, pe cînd cealaltă parte este integrată în biostructura (apa asimilată) și nu are însușiri de solvent (postulatul 3.2.); că numai o parte a electroliților este difuzabilă, și anume cea dizolvată și disociată electrolitic în apa liberă a protoplasmei, pe cînd cealaltă parte este integrată în biostructură și nu este difuzabilă (postulatul 3.3.) și că factorul principal care determină asimetria distribuției electroliților între protoplasmă (ansamblul protoplasmatic) și lichidul interstițial (extracelular) este biostructura (postulatul 3.4.) [3].

În aceste condiții, concentrația unor ioni în celulă nu mai poate fi definită prin raportul dintre cantitatea totală a acestor ioni în protoplasmă și cantitatea totală a apei din protoplasmă — cum susține teoria membranei, ci numai prin raportul dintre cantitatea ionilor aflați exclusiv în apa liberă a protoplasmei și cantitatea acestei ape. Înseamnă că în teoria

biostructurii, noțiunea de „concentrația ionilor în celula vie" are un alt sens, profund deosebit de acela care îi este atribuit de teoria membranei.

2. CONCENTRAȚIA IONILOR DE SODIU ÎN AXONII GIGANȚI DE SEPIA

Teoria membranei

După teoria membranei, conform postulatelor 1.2. și 1.3. menționate mai sus, concentrația ionilor de sodiu — respectiv a ionilor de sodiu radioactiv — în celulele vii este exprimată de raportul dintre cantitatea totală a acestor ioni menționați și cantitatea totală a apei aflate în celule. De aceea, pentru a stabili această concentrație, A. J. Hodgkin și R. D. Keynes au apelat direct la rezultatele analizelor efectuate pe axoni. Cantitatea totală de apă a fost determinată după prealabila „spălare a fibrei cu apă de mare cu colină și fără potasiu, prin tăierea celor 22 mm centrali și uscarea lor pe un fir de cuarț; sodiul marcat a fost apoi determinat cu un contor Geiger, iar sodiul total a fost determinat prin analiza de activare (Keynes și Lewis, 1951) [9]" [6]. Pe baza raporturilor corespunzătoare dintre datele analitice obținute, s-a ajuns la concluzia că concentrația sodiului total în axonii vii de *Sepia* este de 40 mM/l, adică mult mai mică decît în apa de mare, unde concentrația lui este de 486 mM/l [6]. De altfel, această valoare de 40 mM/l „este dată atît de Keynes și Lewis (1951) cît și de alte analize efectuate pe fibre proaspete" [6].

Teoria biostructurii

După teoria biostructurii, conform postulatelor 3.2. și 3.3. menționate mai sus, numai raportul dintre cantitățile ionilor de sodiu — respectiv a ionilor de sodiu radioactiv — aflați în apa liberă a protoplasmei și cantitatea acestei ape exprimă concentrația acestor ioni în celule vii. Or, A. J. Hodgkin și R. D. Keynes au determinat analitic cantitățile totale de sodiu și de apă din axoni. Prin urmare, datele lor nu pot fi folosite direct pentru a exprima concentrația ionilor de sodiu astfel cum aceasta este definită în teoria biostructurii.

Dacă ținem însă seama de faptul experimental cunoscut că membranele celulelor vii sînt permeabile pentru electroliți, ajungem la concluzia că concentrația ionilor de sodiu în apa liberă a axonilor vii trebuie să fie egală cu aceea din apa de mare (486 mM/l).

Valoarea atît de mică, de numai 40 mM/l, obținută de A. J. Hodgkin și R. D. Keynes pentru concentrația sodiului în axonii vii, definită prin teoria membranei, se explică prin faptul că sodiul a fost raportat la o cantitate de apă (apa totală) cu mult mai mare decît aceea în care el este realmente dizolvat (apa liberă a materiei nevii). Dacă admitem că sodiul nu participă decît, poate, în cantitate mică la alcătuirea biostructurii [3] și că mai toată cantitatea lui se află dizolvată în apa liberă a protoplasmei*), atunci cifrele stabilite de A. J. Hodgkin și R. D. Keynes ne

*) Dovezi experimentale în acest sens se aduc în lucrarea „Ionii de potasiu, calciu și sodiu din sucurile frunzelor de porumb" de E. Macovschi și Irina Marineanu (sub tipar).

permit să aflăm cantitatea acestei din urmă fracţii a apei celulare. În adevăr: concentraţia sodiului în axonii vii fiind de 486 mM/l, înseamnă că cei 40 mM sînt dizolvaţi nu într-un litru de apă, ci în 82,3 ml, cantitate ce poate fi calculată prin regula de trei simplă. Rezultă că din totalul apei cuprinse în axonii vii, numai 82,3% reprezintă apa liberă a materiei nevii, pe cînd restul de 917,7‰ este apa asimilată, adică integrată în biostructură.

3. MECANISMUL ÎNCĂRCĂRII AXONILOR CU IONII DE SODIU RADIOACTIV

Pentru introducerea ionilor de sodiu radioactiv în axoni, aceştia au fost stimulaţi „la 50 imp/sec timp de 5—10 minute în aproximativ 3 ml de apă de mare artificială ce conţinea 486 mM sodiu marcat cu Na^{24} (amestecul de Na^{23} şi Na^{24} din aceste soluţii va fi numit sodiu marcat şi va fi însemnat cu Na^{*})" [6]. Stimularea s-a făcut şi „cu 156 imp/sec. timp de 4 minute în apă de mare cu Na^{24}" [6]. Se constată că în aceste condiţii, o cantitate relativ mare de ioni de sodiu, deci şi de sodiu radioactiv, pătrunde şi se acumulează în axoni. Faptului acestuia cele două teorii îi dau explicaţii diferite.

Teoria membranei

După teoria membranei, concentraţia ionilor de sodiu în axonii vii (40 mM/l) este mult mai mică decît în apa de mare (486 mM/l), ceea ce înseamnă că între exteriorul şi interiorul axonilor există un gradient perpetuu de concentraţie a ionilor de sodiu. „Cînd o fibră nervoasă este stimulată ea suferă schimbări rapide ale permeabilităţii, care la rîndul lor permit... sodiului... să se mişte conform gradientului de concentraţie. De aceea, efectul unui tren de impulsuri constă în creşterea concentraţiei sodiului... în interiorul celulei" [6]. Datele analitice interpretate de pe poziţiile teoriei membranei arată că, la sfîrşitul stimulării, concentraţia ionilor de sodiu în axoni (82 mM/l), deşi crescută faţă de concentraţia iniţială (40 mM/l), rămîne totuşi inferioară concentraţiei sodiului în apa de mare (486 mM/l).

Remarcăm că, după teoria membranei, impulsurile electrice acţionează numai asupra membranei celulare (adică asupra periferiei celulei) şi măresc permeabilitatea acesteia; eventualele efecte asupra conţinutului celular, adică asupra protoplasmei, nu sînt luate în considerare (concluziile 1.8 şi 1.9. din lucrarea [3]).

Teoria biostructurii

După teoria biostructurii, concentraţia ionilor de sodiu în axonii vii (486 mM/l) este egală cu aceea din apa de mare în care ei se găsesc (486 mM/l), ceea ce înseamnă că între exteriorul şi interiorul axonilor nu există vreun gradient de concentraţie al ionilor amintiţi. Cînd o fibră nervoasă este stimulată, biostructura se destramă parţial şi pune în libertate, pe lîngă alte substanţe, o parte din apa asimilată. Apa eliberată din biostructură se adaugă la apa liberă a axonului, în care se găsesc ionii de sodiu. Datorită acestui fenomen, concentraţia sodiului în axon scade şi

devine mai mică decît în apa de mare. Astfel se creează un gradient de concentraţie care face ca sodiul din apa de mare să pătrundă în axon, tinzînd la stabilirea echilibrului de difuzie. Îndată după terminarea stimulării, materia vie din axon se reface, apa care a fost eliberată se reintegrează în biostructură şi astfel cantitatea de apă liberă din axon revine la normal *). Cum în axon se găseşte acum o cantitate de sodiu mai mare decît înainte de stimulare, concentraţia acestuia creşte şi devine mai mare decît în apa de mare.

Remarcăm că, după teoria biostructurii, impulsurile electrice acţionează mai ales asupra materiei vii din celule (adică asupra părţii principale a conţinutului celular), provocînd destrămarea parţială, dar reversibilă a structurii acesteia, însoţită de eliberarea şi — ulterior — de reintegrarea unei părţi a apei asimilate (concluziile 3.8. şi 3.9. din lucrarea [3]). Această explicaţie nu exclude modificări ale permeabilităţii membranelor celulare, provocate de curentul electric stimulator, modificări care în timpul stimulării pot favoriza schimbul de sodiu între axon şi apa de mare. Datorită însă egalităţii concentraţiilor sodiului în mediile intra- şi extracelular, aceste modificări ale permeabilităţii nu pot avea nici o repercusiune asupra repartiţiei ionilor de sodiu între cele două medii, dacă nu intervin în axoni fenomenele de scădere iniţială şi creştere ulterioară a concentraţiei acestor ioni, condiţionate de destrămarea parţială şi reversibilă a biostructurii sub acţiunea curentului electric stimulator.

4. EFLUXUL IONILOR DE SODIU DIN AXONII ÎNCĂRCAŢI CU SODIUL MARCAT

Dacă după încărcarea sa cu sodiu marcat axonul este introdus în apă de mare normală, se constată că imediat începe ieşirea ionilor de sodiu din axon. Efluxul acesta a fost măsurat de A. J. Hodgkin şi R. D. Keynes printr-un procedeu ingenios, şi anume :

Axonul încărcat cu sodiu marcat se introducea într-un tub capilar lung de 22 mm al aparatului propus de R. D. Keynes (fig. 1). Apoi se trecea prin aparat un curent de apă de mare normală, cu o viteză de aproximativ 10 ml pe minut. Totodată, o parte din apa de mare care trece prin aparat se aspira cu ajutorul unei seringi acţionată de motor prin braţul lateral al tubului capilar, viteza de aspiraţie fiind de aproximativ 0,3—0,5 ml pe minut. „Astfel, radioactivitatea a fost colectată de pe lungimea fibrei din tubul capilar, dar nu şi de la capete (ele erau spălate de curentul de apă de mare inactivă ce curgea cu 10 ml/minut). După culegerea a 6 ml lichid, tubul colector se lua de pe braţul lateral şi conţinutul seringii se injecta într-un tub de testare... Apoi tubul de colectare şi seringa se spălau... Pe tot timpul acestei operaţii, care dura aproape 2 minute, o seringă auxiliară aspira lichidul din braţul lateral, pentru a preveni acumularea ionilor radioactivi atît în tubul capilar, cît şi în braţul lui lateral" [6]. „Probele de lichid care au trecut pe lîngă axon au fost colectate şi numărate la intervale de aproximativ 12 minute" [6]. „Radioactivitatea efluxului se măsura într-un contor cu lichid (20th -Century Electronica, Type M6M" [6].

*) Dovezi experimentale în acest sens se aduc în lucrarea „Concentraţia sucurilor obţinute din frunze iradiate în ultraviolet" de E. Macovschi şi S. Ceauşescu (sub tipar).

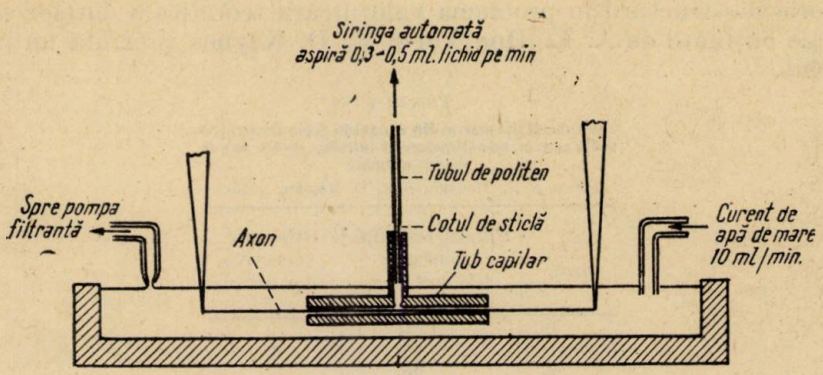


Fig. 1. — Aparatul R. D. Keynes pentru cercetarea schimburilor ionice dintre axoni și apa de mare (după A. L. Hodgkin și R. D. Keynes, 1955).

„Metoda descrisă ... ne-a dat efluxul sub forma vitezei cu care Na... marcat părăsea fibra" [6] „Aria membranei din care s-a colectat Na^{24} s-a calculat cunoscînd diametrul axonului și lungimea totală a capilarei în care era plasat" [6]. „S-a constatat că... efluxul sodiului marcat scădea exponențial pe măsură ce Na^{24}, intrat în timpul stimulării, se eli-

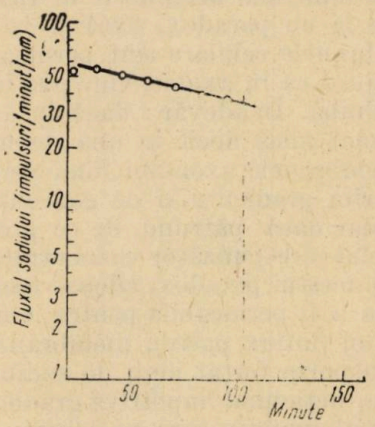


Fig. 2. — Curba efluxului sodiului marcat din axon, exprimată în numărul de impulsuri pe minut pe mm (după A. L. Hodgkin și R. D. Keynes, 1955).

mina progresiv din axon. În fig. 2, curba de scădere exponențială este prezentată în scara logaritmică" [6]. Din această curbă se calcula efluxul sodiului marcat și se exprima în pM/cm^2 sec. Datele obținute sînt trecute în tabela 1.

Este de remarcat că datele din tabela 1 reprezintă rezultatul obiectiv al unor determinări experimentale și cifrele obținute nu depind de nici o concepție teoretică. În schimb, interpretarea lor, precum și descoperirea fenomenelor și legilor care stau la baza lor, depind de concepția teoretică prin care ele sînt examinate. De aceea, confruntarea teoriei membranei

cu teoria biostructurii în problema valorificării teoretice a datelor experimentale obținute de A. L. Hodgkin și R. D. Keynes prezintă un interes deosebit.

Tabela 1

Efluxul sodiului marcat din axonul de Sepia încărcat cu sodiu marcat, prin stimulare, și introdus apoi în apă de mare normală

(După A. L. Hodgkin și R. D. Keynes, 1955)

t. min.	Fluxul sodiului marcat pM/cm² sec	Diferențe succesive de eflux
0	(43)*	
20	37	6
40	32	5
60	28	4
80	24	4
100	21	3

*) Valoarea 43 pM/cm² sec a fost dedusă de noi prin extrapolare, admițînd că prima diferență este egală cu 6.

Teoria membranei

Conform acestei teorii, concentrația ionilor de sodiu în axonul viu de *Sepia* (40 mM/l) este mult mai mică decît în apa de mare (486 mM/l). Această concluzie duce la un paradox, dacă se ia în considerare faptul că pe de o parte membranele celulare sînt permeabile pentru electroliți, iar pe de altă parte faptul că în axonul viu, pus în apă de mare, cantitatea sodiului nu se schimbă. În adevăr : dacă în axonul viu concentrația ionilor de sodiu este mai mică decît în apa de mare (afirmația teoriei membranei), atunci membranele axonului fiind permeabile pentru acești ioni, urmează ca datorită gradientului de concentrație, ionii de sodiu să pătrundă în axon ; dar dacă pătrund, de ce proporția lor nu crește, ci rămîne mereu la nivelul corespunzător concentrației de 40 mM/l ?

Pentru explicarea acestui paradox, adepții teoriei membranei admit că pe lîngă însușirea de a fi permeabile pentru ionii de sodiu, permițînd influxul acestora în axon (influx pasiv), membranele celulare au capacitatea specială de a transporta forțat ionii de sodiu în sens invers, adică din axon în apa de mare, acționînd împotriva gradientului de concentrație (eflux activ). Mecanismul ipotetic care ar asigura acest transport activ a fost numit „pompa de sodiu". Se afirmă că prin acest mecanism membranele celulelor vii ar elimina din axon, fără întrerupere, cantitățile de ioni de sodiu corespunzătoare celor care pătrund continuu în axon din apa de mare (influx pasiv). Astfel, între influxul pasiv și efluxul activ s-ar realiza acel echilibru care asigură menținerea concentrației constante și scăzute a ionilor de sodiu în axonii vii.

Pentru a demonstra activitatea pompei, era necesar să se pună în evidență existența unui eflux activ de sodiu din celulele vii, adică a unui eflux contra gradientului de concentrație.

Deși rezultatele din tabela 1 indică existența unui astfel de eflux totuși ele nu se referă decît la efluxul sodiului marcat, și nu a sodiului total care părăsește axonul. De aceea, A. L. Hodgkin și R. D. Keynes au trecut la calculul efluxului total de sodiu. Pentru aceasta era necesar

să se cunoască raportul sodiului marcat Na^* față de sodiul total Na_i aflat în axoplasmă în orice moment dat. Acest raport, măsurat la sfîrșitul experienței, a fost de 0,30, pe cînd concentrația totală a sodiului în axoplasmă a fost de 50 mM (tabela 2). Valorile pentru sodiul total la alte timpuri au fost aproximate prin rezolvarea numerică a ecuațiilor:

$$\frac{d\,[Na]_i}{dt} = \frac{a}{2}\left(M_{int}^{Na} - M_{ext}^{Na}\right) \qquad (I)$$

$$M_{ext}^{Na} = \frac{[Na]_i}{[Na^*]_i} \cdot M_{ext}^{Na^*} \qquad (II)$$

unde: $[Na^*]_i$ și $[Na]_i$ sînt concentrațiile sodiului marcat și total, $M_{ext}^{Na^*}$ și M_{ext}^{Na} sînt efluxurile corespunzătoare, a este raza fibrei și M_{int}^{Na} este influxul, presupus constant. Valorile alese pentru M_{int}^{Na} au fost ajustate prin încercări, pînă ce soluția numerică a dat pentru $[Na]_i$ valoarea finală egală cu cea observată experimental. Valoarea inițială a $[Na]_i$ a putut fi obținută, fără eroare prea mare, din valoarea inițială a $[Na^*]_i$ prin metoda schițată în subsolul tabelei 2. Rezultatele acestei analize indirecte sînt date în tabela 2. Ele arată că după 4 minute de stimulare cu 156 imp/sec, concentrația sodiului total crește de la 40 mM la 82 mM/l. Apoi, sodiul total scade datorită pompării lui mai mari în afară decît înăuntru. Viteza de expulzare a sodiului se micșorează o dată cu scăderea cantității de sodiu care a mai rămas în interior și, după 100 minute, ajunge la 33 pM/cm² sec (tabela 2, col. 5).

Tabela 2

Analiza experienței consemnate în figura 2
Diametrul axonului – 189 μ. Între t = –4 minute și t = 0, axonul a fost stimulat la 156 imp/sec, în apă de mare conținînd sodiu marcat. De la t = 0 încolo, axonul a fost pus în apă de mare neradioactivă

(După A.K. Hodgkin și R.D. Keynes, 1955)

t timpul după sfîrșitul stimulării (min.)	$[Na^*]$ mM	$[Na]$ mM	$M_{ext}^{Na^*}$ eflux de Na^* (pM/cm² sec)	M_{ext}^{Na} eflux de Na (pM/cm² sec)
1	2	3	4	5
–4	0	(40)	—	—
0	72	82	—	—
20	62	74	37	44
40	53	67	32	40
60	45	61	28	38
80	38	56	24	35
100	33	51	21	33
. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
293	15	50	—	—

Influxul pentru t > 0 : 15,3 pM/cm² sec. Eflux de sodiu pe impuls 10 pM/cm²
Influxul de sodiu pe impuls = 15 pM/cm². Intrarea netă a sodiului pe impuls : 5 pM/cm²

METODA DE CALCUL ȘI APROXIMAȚIILE

Coloana (4) este obținută din curba experimentală din figura 2.
Coloana (2) este obținută prin adăugarea Na^* terminal la valoarea obținută prin integrarea coloanei (4) pe intervalul corespunzător de timp.
În *coloana* (3) prima valoare (care are foarte puțină importanță pentru restul tabelei) este luată de la Keynes și Lewis (1951) și de la alte analize făcute pe fibre proaspete. Valoarea a doua este calculată din $[Na^*] = 72$ mM la $t = 0$ și $[Na] = 40$ mM la $t = -4$ pe baza presupunerii că raportul influxului față de eflux în timpul stimulării este de 1,5 după Keynes (1951 a). Aceasta dă de asemenea și valorile arătate în subsolul tabelului. Valorile care urmează în coloana (3) sînt calculate din ecuațiile (1) și (2) folosind un influx de 15,3 pM/cm²sec.
Coloana (5) = coloana (4) x coloana (3)/coloana (2).

Rezultatele calculelor efectuate conform postulatelor teoriei membranei şi cuprinse în tabela 2 arată că deşi în axonul viu concentraţiile sodiului marcat (coloana 2) în cele ale sodiului total (coloana 3) sînt mult mai mici decît în apa de mare (486 mM/l), totuşi se produce un puternic eflux de sodiu marcat (coloana 4) şi de sodiu total (coloana 5). Înseamnă că efluxul acesta se produce contra gradientului de concentraţie şi este deci un „eflux activ". Prin urmare, din punctul de vedere al teoriei membranei, datele experimentale obţinute de A. L. Hodgkin şi R. D. Keynes concordă cu ipoteza despre existenţa unei pompe de sodiu în membranele axonilor vii.

Teoria biostructurii

După cum s-a arătat mai înainte, în lumina teoriei biostructurii, concentraţia ionilor de sodiu în axonul de *Sepia* urmează să fie calculată ţinînd seama numai de fracţiunea de apă liberă, nu şi de cea integrată în biostructură (apa asimilată). Raportînd deci, datele stabilite de A. L. Hodgkin şi R. D. Keynes la apa liberă din axon (82,3 ml) şi nu la 1 litru (ca în cazul teoriei membranei), ajungem la rezultatul că în axonul încărcat cu sodiu marcat concentraţia sodiului marcat ajunge la 875 mM/l, iar aceea a sodiului total la 996 mM/l, depăşind deci cu mult pe aceea din apa de mare (486 mM/l).

În aceste condiţii, dat fiind că membranele celulare sînt permeabile pentru electroliţi, urmează ca la axonii încărcaţi cu sodiu marcat să aibe loc difuzia ionilor de sodiu din axon în apa de mare. Prin urmare : efluxul măsurat de A. L. Hodgkin şi R. D. Keynes *nu* este un „eflux activ", acţionat de pompa de sodiu împotriva gradientului de concentraţie (teoria membranei), ci un eflux de difuzie conform gradientului de concentraţie dintre axon şi apa de mare. Or, *dacă efluxul menţionat reprezintă un fenomen de difuzie, el trebuie să se producă conform legii difuziei, adică scăderea concentraţiei sodiului total în axon în funcţie de timp trebuie să satisfacă legea lui Fick.*

Pentru verificarea acestei concluzii, bazată pe aplicarea teoriei biostructurii la rezultatele experimentale obţinute de A. L. Hodgkin şi R. D. Keynes este necesar :

a. — să examinăm rezultatele experimentale menţionate şi să calculăm, prin prisma teoriei biostructurii, influxul şi efluxurile de sodiu la axonul încărcat cu sodiu marcat şi introdus apoi în apa de mare normală ;

b. — să deducem din legea lui Fick ecuaţia de difuzie corespunzătoare condiţiilor în cadrul cărora se face schimbul ionic între axonul încărcat cu sodiu marcat şi apa de mare normală şi să verificăm aplicabilitatea ei la efluxul respectiv.

a. Influxul şi efluxurile de sodiu la axonul încărcat cu sodiu marcat şi apoi plasat în apă de mare

Influxul şi efluxurile sodiului la axonul de *Sepia* încărcat prin stimulare electrică cu sodiu marcat şi apoi plasat în apă de mare normală sînt prezentate în fig. 3.

I — reprezintă influxul sodiului nemarcat, care pătrunde din apa de mare în axon. Influxul acesta a fost măsurat de A. L. Hodgkin şi R. D. Keynes şi este de 15,3 pM/cm² sec imediat după stimulare [6] şi de 32 pM/cm² sec cu 0,5—4 ore mai tîrziu [6]. El se datoreşte permeabilităţii membranelor celulare pentru electroliţi, care permite schimbul liber de ioni între celulele vii şi mediul extracelular, dar nu duce la creşterea concentraţiei ionilor de sodiu în axon, datorită efluxului compensator (E_c de ioni de sodiu care ies din axon.

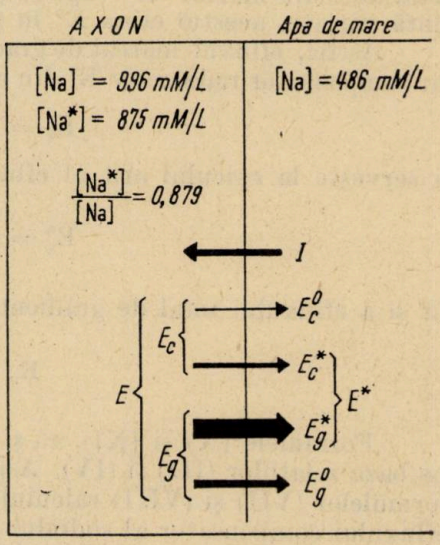


Fig. 3. — Influxul şi efluxurile de sodiu la axonul încărcat cu sodiu marcat şi introdus la apă de mare normală.

Pe cînd prin influxul I pătrund în axon numai ioni de sodiu nemarcat, prin efluxul compensator E_c părăsesc axonul atît ioni de sodiu nemarcat (eflux compensator nemarcat E_c^0) cît şi de sodiu marcat (eflux compensator marcat E_c^*). Se înţelege că efluxurile ionilor celor două categorii de sodiu, nemarcat şi marcat, au loc corespunzător proporţiilor lor respective în axon, care pot fi exprimate în funcţie de sodiul total. Cum analizele directe ne dau cantitatea de sodiu total Na şi pe aceea de sodiu marcat Na *, diferenţa lor reprezintă sodiul nemarcat Na° (III):

$$Na^\circ = Na - Na^* \qquad (III)$$

Însemnînd cu r raportul dintre sodiul marcat Na* şi sodiul total Na (IV)

$$\frac{Na^*}{Na} = r \qquad (IV)$$

vom avea formulele (V) şi (VI):

$$Na^\circ = (1 - r)\,Na \qquad (V)$$

$$Na^* = rNa \qquad (VI)$$

Astfel unui influx I îi corespund efluxurile compensatoare E_c^0 şi E_c^*, care pot fi calculate cu ajutorul formulelor (VII) şi (VIII), corespunzătoare formulelor (V) şi (VI):

$$E_c^0 = (1 - r)I \qquad (VII)$$

$$E_c^* = rI \qquad (VIII)$$

mărimile I şi r fiind determinabile experimental.

Pe lîngă efluxul compensator, axonul încărcat cu sodiu marcat mai prezintă şi un eflux de gradient E_g, datorit gradientului de concentraţie dintre axon şi apa de mare. Ca şi efluxul compensator, efluxul de gradient este format dintr-un eflux al sodiului marcat (eflux marcat de gradient E_g^*) şi dintr-un eflux al sodiului nemarcat (eflux nemarcat de gradient E_g^0). Şi aceste efluxuri pot fi calculate dacă se ţine seama de faptul că efluxul măsurat de A. L. Hodgkin şi R. D. Keynes reprezintă efluxul total de sodiu marcat E^* (fig. 3) şi că cifrele cuprinse în tabela 1 reprezintă variaţia acestui eflux E^* în funcţie de timp.

Astfel, efluxul marcat de gradient E_g^* se obţine prin scăderea efluxului compensator radioactiv E_c^* din efluxul marcat total E^* (IX):

$$E_g^* = E^* - E_c^* \qquad (IX)$$

şi serveşte la calculul atît al efluxului nemarcat de gradient E_g^0 (X):

$$E_g^0 = \frac{1 - r}{r} E_g^* \qquad (X)$$

cît şi a efluxului total de gradient E_g (XI):

$$E_g = \frac{E_g^*}{r} \qquad (XI)$$

Formulele (X) şi (XI), ca şi formulele (VII) şi (VIII), sînt deduse pe baza relaţiilor (III) şi (IV). Aspectele lor însă diferă, deoarece în cazul formulelor (VII) şi (VIII) calculul efluxurilor se face pe baza cunoaşterii efluxului compensator al sodiului total, egal cu influxul I măsurat experimental, pe cînd în cazul formulelor (X) şi (XI) calculul se face pe baza cunoaşterii efluxului marcat de gradient E_g^*, dedus la rîndul lui din efluxul marcat total E^*, de asemenea măsurat.

Rezultatele experimentale obţinute de A. L. Hodgkin şi R. D .Keynes cuprind suficiente date pentru stabilirea întregului bilanţ al schimburilor ionice dintre axonul încărcat cu sodiu marcat şi apa de mare normală. Pentru exemplificare, vom da calculele care permit verificarea cantitativă a fenomenelor din decursul primelor 20 minute ale experienţei analizate (v. tabela 1).

Influxul fiind de 15,3 pM/cm² sec, înseamnă că în decurs de 20 minute pătrund în axon, pe cm², 18,4 nM sodiu nemarcat.

Concentraţiile iniţiale ale sodiului marcat şi celui total fiind de 875 mM/l, respectiv 996 mM/l, iar raportul lor (IV) fiind r=0,879, înseamnă că în aceeaşi perioadă de timp ies din axon pe cm², prin eflux compensator, conform formulei (VII), 2,2 nM sodiu nemarcat şi — conform formulei (VIII), 16,2 nM sodiu marcat. Totodată, concentraţia sodiului total în axon scade la 74 mM/82,3 ml, adică la 899 mM/1 (în tabela 2, col. 3, rîndul 3, sodiul total este raportat la 1 litru apă).

Efluxul marcat total fiind la început de 43 pM/cm² sec, iar după 20 minute de 37 pM/cm² sec (tabela 1) — în medie 40 pM/cm² sec — înseamnă că în acest interval de timp părăsesc axonul, pe cm², 48,0 nM sodiu marcat, din care 16,2 nM reprezintă efluxul marcat compensator, calculat conform formulei (VIII), iar 31,8 nM reprezintă efluxul marcat de gradient, calculat conform formulei (IX). Acestui eflux îi corespunde

efluxul nemarcat de gradient de 4,4 nM, calculat după formula (X), şi efluxul total de gradient de 36,2 nM, calculat după formula (XI).

Rezultă că în decursul primelor 20 minute, cantitatea sodiului total se micşorează cu 36,2 nM, iar concentraţia lui scade de la 996 mM/l la 899 mM/l, adică cu 97 000 000 nM/l. Raportul dintre concentraţia şi cantitatea sodiului total, exprimate în nM/l respectiv nM, este aşadar (XII) :

$$\frac{97\,000\,000}{36{,}2} = 2\,679\,000 \qquad \text{(XII)}$$

Ţinînd seama de acest raport şi de concentraţiile sodiului total la început şi după 20 minute, se pot calcula cantităţile corespunzătoare de sodiu, care sînt : 371 nM şi 335 nM.

Rezultatele tuturor acestor calcule sînt prezentate schematic în tabela 3. Se constată că în decurs de 20 de minute concentraţiile sodiu-

Tabela 3

Bilanţul schimburilor de sodiu dintre axonul încărcat cu sodiu marcat şi apa de mare normală în cursul primei perioade de 20 minute

Influx 15,3 pM/cm² sec, respectiv 18,4 nM/cm² 20 min.
Eflux marcat total iniţial : 43 pM/cm² sec, final 37 pM/cm² sec.
Eflux marcat total mediu : 40 pM/cm² sec, respectiv 48 nM/cm² 20 min.

		$r = 0{,}879$			
t min	Na nM/373 nl	Na^0 nM/373 nl	Na^* nM/373 nl	Schimbul ionic	Calcul după formula
0	371	45	326		
	+18,4	+18,4	0	influx I	
					(VII)
		− 2,2		eflux E_c^0	
	−18,4				
			−16,2	eflux E_c^*	(VIII)
			−31,8	eflux E_g^*	(IX)
	−35,8				
		− 4,4		eflux (E_g^0	
					(X)
	−36	+12	−48	total	
20	335	57	278		

$r = 0{,}830$

lui total şi marcat din axon scad, pe cînd concentraţia sodiului nemarcat creşte, şi că raportul dintre concentraţia sodiului marcat şi a celui total se schimbă de la 0,879 la 0,830.

În mod asemănător se efectuează calculele pentru următoarele perioade de timp, ţinînd seama de rezultatele calculului precedent, de valorile fluxului marcat din tabela 1 şi de faptul că influxul este variabil, crescînd cu scăderea concentraţiei sodiului în axon. După A.L. Hodgkin şi R.D. Keynes, la început influxul este 15,3 pM/cm²sec [6], iar după 0,5—4 ore el devine 32 pM/cm²sec. Admiţînd că în primă aproximaţie influxul creşte linear în funcţie de timp, noi am adoptat pentru calcul o

creştere de 1,7 pM/cm² sec pentru fiecare perioadă de 20 minute, ceea ce înseamnă că după 3 ore şi 20 minute influxul atinge valoarea 32,3 pM/cm² sec, încadrabilă în valorile stabilite experimental.

Tabela 4 cuprinde valorile influxului, corespunzătoare fiecărui timp dat, precum şi valorile raportului r şi ale concentraţiei sodiului

Tabela 4

Influxul sodiului, valorile raportului r dintre concentraţiile sodiului marcat şi total, precum şi concentraţia sodiului total în axonul încărcat cu sodiul marcat şi introdus apoi în apa de mare normală

t min	Influxul de sodiu pM/cm² sec	Influxul de sodiu nM/cm² 20 min.	r	Concentraţia sodiului total n M/373 nl
1	2	3	4	5
0	15,3	18,4	0,879	371
20	17,0	20,4	0,830	335
40	18,7	22,4	0,777	305
60	20,4	24,5	0,715	281
80	22,1	26,5	0,649	262
100	23,8	28,6	0,579	247

total în azon. După teoria biostructurii, variaţia acestei cencentraţii în funcţie de timp trebuie să corespundă legii difuziei a lui Fick.

b. Ecuaţia difuziei pentru schimburile ionice dintre axonul încărcat cu sodiu marcat şi apa de mare ; verificarea aplicabilităţii ei la efluxul de gradient

Conform legii difuziei, stabilită de Fick (XIII), cantitatea dx a substanţei care în decursul timpului dt difuzează prin membrana cu suprafaţa dq şi grosimea dg este proporţională cu diferenţa de concentraţie dc a substanţei între cele două medii separate prin membrană. Coeficientul de difuzie este notat prin D :

$$dx = - D \frac{dq}{dg} dc.dt \qquad \text{(XIII)}$$

Or, în cazul schimburilor ionice dintre axon şi apa de mare, difuzia se face prin membranele celulare a căror suprafaţă Q şi grosimea G sînt constante. La început, cînd t = 0, diferenţa de concentraţie a sodiului dintre axon şi apa de mare este A — 0_0, A fiind concentraţia iniţială a sodiului în axon, iar c_0 concentraţia constantă a sodiului în apa de mare. Pe parcurs, diferenţa de concentraţie devine (A — x) — c_0, dat fiind că concentraţia sodiului în axon scade pe măsură ce ionii lui părăsesc axonul, în timp ce concentraţia de sodiu din apa de mare c_0 rămîne constantă

din cauza primenirii continue a apei în aparat (fig. 1). În aceste condiții, legea lui Fick capătă expresia (XIV):

$$dx = k\,[A-x) - c_0]dt \qquad (XIV)$$

în care k reprezintă ansamblul mărimilor constante — D, Q și G.

Prin separarea variabilelor x și t se ajunge la ecuația diferențială (XV)

$$\frac{dx}{(A-x)-c_0} = k\,dt \qquad (XV)$$

care, integrată, devine (XVI)

$$\ln[(A-x) - c_0] = kt + C, \qquad (XVI)$$

unde C este constanta de integrare.

Din condițiile limită: $t = 0$, $x = 0$, se deduce expresia constantei C (XVII)

$$C = \ln(A - c_0) \qquad (XVII)$$

Ținînd cont de (XVII) și trecînd la logaritmii zecimali prin factorul de transformare 2,303 — ajungem la forma explicită (XVIII) a ecuației (XVI):

$$\log\,[(A - c_0) - x] - \log\,(A - c_0) = Kt \qquad (XVIII)$$

care permite calculul constantei K, parametrii A, c_0 și x fiind cunoscuți (tabela 5). Notăm că legătura între constantele k (XVI) și K (XVIII) este $K = \frac{k}{2{,}303}$.

Tabela 5

Constanta K calculată cu ajutorul formulei (XVIII) în care: A = 371 nM/373nl c_0 = 181 nM/373nl iar x reprezintă efluxul de gradient al sodiului total (E_0) ce se obține prin scăderea concentrațiilor sodiului total la timpurile t din concentrația inițială A

t min	[Na] nM/373 nl	x	K
0	371	0	—
20	335	36	0,00456
40	305	66	0,00463
60	281	90	0,00465
80	262	109	0,00463
100	247	124	0,00459
		K medie:	0,00461

Concordanța dintre valorile constantei K, calculate pentru diferite tipuri t, arată că efluxul sodiului total din axonul de *Sepia* încărcat cu sodiu marcat și introdus în apa de mare normală urmează legea difuziei și, prin urmare, este un eflux de difuzie, conform gradientului de concentrație dintre axon și apa de mare.

O dată stabilită valoarea numerică a constantei K, se poate calcula efluxul de gradient al sodiului total E_g cu ajutorul formulei (XIX):

$$E_g = x = (A - c_0) - 10^{\log(A-c_0)-Kt} \qquad (XIX)$$

dedusă din ecuația (XVIII), iar prin scăderea acestuia din concentrația inițială A a sodiului total din axon, se poate afla variația sodiului total Na în funcție de timp (XX):

$$Na = A - E_g \qquad (XX)$$

Se constată (tabela 6) că valorile astfel calculate concordă cu cele deduse din datele experimentale ale lui A. L. Hodgkin și R. D. Keynes,

Tabela 6

Efluxul de gradient al sodiului total (E_g) și concentrația sodiului total în axon Na deduse din datele experimentale și calculate cu ajutorul ecuației de difuzie (XIX) respectiv (XX), în care: A = 371 nM/373 nl; C_0 = 181 nM/373 nl; K = 0,00461

t min	E_g nM/cm² 20 min dedus din datele experimentale	E_g nM/cm² 20 min calculat	[Na] dedusă din datele experimentale nM/373 nl	[Na] calculată nM/373nl
1	2	3	4	5
0	—	—	371	371,0
20	36	36,3	335	334,7
40	66	65,7	305	305,3
60	90	89,5	281	281,5
80	109	108,7	262	262,3
100	124	124,3	247	246,7

ceea ce demonstrează că efluxul respectiv se produce conform legii lui Fick și că interpretarea schimbului de ioni de sodiu între axonul de *Sepia* și apa de mare de pe pozițiile concepției biostructurale este pe deplin justificată.

5. ÎNCHEIERE

Scopul urmărit în această lucrare a fost atins: s-a demonstrat că noua teorie a permeabilității celulare — teoria biostructurii — izvorîtă din concepția biostructurală cu privire la natura viului, permite valorificarea dintr-un nou punct de vedere a datelor experimentale obținute de A. L. Hodgkin și R. D. Keynes în 1955, cu ocazia cercetării efluxului de sodiu din axonii giganți de *Sepia*.

Spre deosebire de teoria membranei, după care efluxul menționat s-ar face împotriva gradientului de concentrație prin intervenția unei pompe de sodiu localizate în membranele celulelor vii, teoria biostructurii arată că efluxul acesta se produce conform gradientului de concentrație, fiind un fenomen de difuzie supus legii lui Fick. Astfel, datele experimen-

tale obținute de A. L. Hodgkin și R. D. Keynes capătă, în lumina teoriei biostructurii, o altă semnificație decît aceea care le-a fost atribuită pînă acum și indică manifestarea altor fenomene, supuse altor legi, decît cele preconizate de teoria membranei :

Energia provenită din metabolism are un rol esențial în distribuția asimetrică a sodiului dintre axonul viu și apa de mare : ea intervine însă prin biostructura protoplasmei, asigurînd existența, starea și funcțiile acesteia, și nu prin punerea în mișcare a unei pompe de sodiu care ar fi localizată în membrana celulară [3].

Faptul că efluxul de sodiu din axonii vii (supraviețuiți) de *Sepia* încărcați cu sodiu marcat se supune legii lui Fick concordă, de altfel, cu rezultatele cercetărilor noastre anterioare efectuate pe membrana branhială vie a peștilor și crustaceelor și pe membrana organismelor monocelulare [10],-[24]. „Ecuațiile de otrăvire" pe care le-am stabilit pe baza legii lui Fick ne-au permis să arătăm că unele substanțe traversează membranele vii amintite conform legii difuziei, și să punem în evidență unele fenomene de adsorbție care se produc la nivelul acestor membrane. Valabilitatea rezultatelor obținute am confirmat-o prin cercetări efectuate cu un aparat special, un model fizico-chimic și funcțional al branchiei de pește, pe care l-am numit „branchia artificială". Cu ajutorul acestui aparat am verificat *in vitro* ecuațiile de otrăvire și am dovedit că ele se aplică *in vivo* numai atunci cînd trecerea substanțelor prin membranele vii este un fenomen de difuzie supus legii lui Fick [25],-[31].

Concluziile care se desprind din lucrarea de față depășesc cadrul strict al schimburilor ionice dintre celulele vii și mediul extracelular. Ele deschid perspectiva înțelegerii și descoperirii unor fenomene noi care se produc în celulele vii.

Spre exemplificare, putem arăta că eliberarea parțială a apei asimilate prin destrămarea parțială și reversibilă a biostructurii sub acțiunea agenților excitanți este însoțită de eliberarea și a altor componente ale biostructurii, inclusiv a electroliților și unor enzime integrate în ea. Astfel se realizează modificări importante ale compoziției și concentrației electroliților, enzimelor și altor compuși aflați în materia nevie a protoplasmei, cu repercusiuni corespunzătoare asupra biochimismului celular. Fenomene de acest gen intervin în procesele de reglare și autoreglare a metabolismului din celulele vii și impun, totodată, revizuirea de pe pozițiile concepției biostructurale a problemei originii potențialelor bioelectrice. Unele cercetări în aceste domenii au fost publicate [32], [33], [34], altele sînt în curs.

6. CONCLUZII

1. Majoritatea apei din axonii vii de *Sepia* este asimilată, adică integrată în biostructură, și numai o mică parte este liberă și participă la alcătuirea materiei nevii a axonilor.

2. Sodiul nu este integrat în biostructură decît, poate, într-o mică măsură, și se află în materia nevie a axonilor, fiind dizolvat și ionizat în apa liberă a acestora.

3. Concentrațiile electroliților în apa liberă a axonilor sînt, în general, egale cu acele din apa de mare.

4. Concentrația ionilor de sodiu în axonii încărcați cu sodiu marcat prin stimulare este mai mare decît în apa de mare.

5. Încărcarea axonilor cu sodiu marcat este o consecință nu atît a modificărilor permeabilității membranelor axonilor sub acțiunea curentului stimulator, cît a destrămării parțiale și reversibile a biostructurii acestora, cu eliberarea și reintegrarea ulterioară a unei părți din apa asimilată.

6. Efluxul de sodiu din axonii încărcați cu sodiu marcat este un fenomen de difuzie supus legii lui Fick.

7. Pentru explicarea schimbului ionilor de sodiu dintre axon și apa de mare nu este nevoie să se recurgă la ipoteza existenței unei pompe de sodiu.

8. Energia provenită din metabolism asigură distribuția asimetrică a sodiului dintre axonul viu și apa de mare prin contribuția ei la menținerea stării și funcțiilor biostructurii protoplasmei și nu prin punerea în mișcare a unei pompe de sodiu localizată în membrana celulară.

BIBLIOGRAFIE

1. E. MACOVSCHI, *Materia vie și geneza ei*, în *Materialismul dialectic și științele contemporane ale naturii*, Edit. politică, București, 1959, p. 155.
   Die lebende Materie und ihre Entstehung, Revue de Chimie **4**, *1*, p. 11 (1959)
2. E. MACOVSCHI, *Unele probleme ale mecanismelor de reglare și ale structurii materiei vii*, St. cerc. biochim. **8**, *3*, p. 253 (1965).
   Some problems of regulation mechanisms and of living matter structure, Rev. roum. biochim. **2**, *2*, 189 (1965).
3. E. MACOVSCHI, *Materia vie și distribuția asimetrică a electroliților între protoplasmă și lichidul interstițial (Bazele teoriei structurii și compararea lor cu bazele teoriilor membranei și absorbției)*, St. cerc. biochim. **8**, *4*, p. 371 (1965).
   Living matter and the asymmetrical distribution of electrolytes between protoplasm and interstitial fluid. (Bases of the theory of structure as compared to the bases of membrane and adsorption theories), Rev. roum. biochim. **2**, *4*, 285 (1965).
4. R. MOND, L, AMSON, *Über die Ionenpermeabilität des quergestreiften Muskels*, PFLÜGER'S Archiv **220**, *1*, 69 (1928)
5. E. MACOVSCHI, *Teoria structurii și repartiția electroliților dintre lichidul de perfuzie și mușchii trenului posterior de broască*, St. cerc. biochim., **9**, *2*, p. 123 (1966).
   The structure theory and the electrolyte distribution between the perfusion fluid and the frog hind limb muscles, Rev. roum. biochim. **3**, *2*, 169 (1966).
6. A. I. HODGKIN, R. D. KEYNES, *Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo*, J. Physiol. **128**, *28* (1955).
7. T. C. RUCH, J. F. FULTON, *Medical Physiology and Biophysics*, Saunders Company, Philadelphia and London, 1960. Cap. I (Walter Woodbury), p. 3—22.
8. J. C. ECCLES, *The physiology of nerve cells*, London, Oxford University Press, 1957, p. 27, 28, 29, 127.
9. * * * *Handbook of Physiology. Section I. Neurophysiology*, vol. I, American Physiology Society, 1959, p. 60.
10. E. MACOVSCHI, EUFROSINA MACOVSCHI, *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen. I. Permeabilität des Kiemenepitheliums von Atherina hepsetus L. für Cetylchinoleiniumchlorid*, Archiv. exper. Pathol. u. Pharmakol. **185**, 309 (1937).
11. E. MACOVSCHI, EUFROSINA MACOVSCHI, *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen. II. Die Permeabilität der Zellenmembran von Paramecium caudatum für einige Substanzen*, Archiv. exper. Pathol. u. Pharmakol. **185**, 566 (1937).
12. E. MACOVSCHI, EUFROSINA MACOVSCHI, *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen. III. Die Permeabilität der Zellen des Kiemenepitheliums von Atherina hepsetus L. für Saponin*, Archiv. exper. Pathol. u. Pharmakol, **188**, 405 (1938).
13. E. MACOVSCHI, EUFROSINA MACOVSCHI, *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen. IV. Permeabilität des Kiemenepitheliums von Gasterosteus für Telepatin*, Arch. exper. Pathol. Pharmakol. **189**, 45 (1938).

14. E. Macovschi, Eufrosina Macovschi, *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen. V. Permeabilität des Kiemenepitheliums von Gasterosteus aculeatus für einige organische Säuren*, Arch. exper. Pathol. Pharmakol. **189**, 140 (1938).

15. E. Macovschi, Eufrosina Macovschi, *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen. VI. Permeabilität des Kiemenepitheliums von Atherina hepsetus L. für Strychnin*, Arch. exper. Pathol. Pharmakol. **189**, 281 (1938).

16. E. Macovschi, Eufrosina Macovschi, *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen. VII. Wirkung der Adsorptionserscheinungen auf die Penetration des Cetylchinoleiniumchlorids durch das Kiemenepithelium von Atherina hepsetus L.*, Arch. exper. Pathol. Pharmakol. **191**, 628 (1938).

17. E. Macovschi, Eufrosina Macovschi, *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen. VIII. Wirkung der Adsorptionserscheinungen auf die Penetration des Saponins in die Zellen des Kiemenepitheliums von Atherina hepsetus L.*, Archiv. exper. Pathol. Pharmakol. **192**, 321 (1939).

18. E. Macovschi, *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen. IX. Die Berechnung der Vergiftungskonstanten nach der Methode der kleinsten Quadrate.* Biochem. Ztschr. **310**, 313 (1942).

19. E. Macovschi, Adela Stancu, *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen. X. Prüfung der Vergiftungsgleichung* $(c - c_0)\ (t - t_0 - m)x = K$ *an der Saponinpenetration in das Kiemenepithelium von Alburnus lucidus Heck*, Biochem. Ztschr. **313**, 250 (1942).

20. E. Macovschi, Eufrosina Macovschi, *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen. XI. Die Giftwirkung von Seewasser verschiedener Konzentration auf Gammarus pulex und einige Vergiftungsgleichungen*, Biochem. Ztschr. **315**, 320 (1943).

21. E. Macovschi, Zenobia Opreanu, *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen. XII. Das Eindringen von Strychnin aus einer injizierten Lösung in den Froschkörper (Rana ridibuna Pall.) und die entsprechende Vergiftungsgleichung*, Biochem. Ztschr. **316**, 359 (1944).

22. E. Macovschi, *Recherches sur la perméabilité des membranes vivantes. XIII. La toxicité de l'eau de mer de différentes concentrations pour Daphnia Magna*, Bull. Scient. Acad. Roumanie **29**, 86 (1946).

23. E. Macovschi, Adela Stancu-Ştefan, *Recherches sur la perméabilité des membranes vivantes. Note XIV. Action toxique du chlorure mercurique sur Daphnia magna*, Bull. Scient. Acad. Roumanie **30**, 139 (1947).

24. E. Macovschi, Adela Stancu-Ştefan, *Recherches sur la perméabilité des membranes vivantes. Note XV. Action toxique du chlorure mercurique sur Perca fluviatilis*, Bull. Scient. Acad. Roumanie, **30**, 338 (1948).

25. E. Macovschi, Georgeta Stan, *Künstliche Kieme als Hilfsmittel zur Untersuchung der Permeabilität lebender Membranen. I. Mitteilung. Prüfung einiger Vergiftungsgleichungen an der Oxalsäurepenetration durch die Cellophanmembran*, Biochem. Ztschr. **310**, 255 (1942).

26. E. Macovschi, Georgeta Stan, *Künstliche Kieme als Hilfsmittel zur Untersuchung der Permeabilität lebender Membranen. II. Mitteilung. Prüfung der Vergiftungsgleichung* $c(t - t_0) = k$ *an der Oxalsäurepenetration durch die Cellophanmembran*, Biochem. Ztschr. **312**, 213 (1942).

27. E. Macovschi, Georgeta Stan, *Künstliche Kieme als Hilfsmittel zur Untersuchung der Permeabilität lebender Membranen. III. Mitteilung. Prüfung einiger Vergiftungsgleichungen an der Kaliumchloridpenetration durch die Cellophanmembran*, Biochem. Ztschr. **313**, 337 (1942).

28. E. Macovschi, Victoria Zinca, *Künstliche Kieme als Hilfsmittel zur Untersuchung der Permeabilität lebender Membranen. IV. Mitteilung. Die Penetration von Amylalkohol durch eine Cellophanmembran*, Biochem. Ztschr. **314**, 373 (1943).

29. E. Macovschi, Victoria Zinca, *Künstliche Kieme als Hilfsmittel zur Untersuchung der Permeabilität lebender Membranen. V. Mitteilung. Die Penetration von Butylalkohol durch eine Cellophanmembrane*, Bull. Scient. Acad. Roumanie **29**, 235 (1946).

30. E. Macovschi, Ana Jivănescu, *La branchie artificielle utilisée comme moyen aidant à la recherche de la perméabilité des membranes vivantes. Note VI. La pénétration du violet de méthyle à travers une membrane de cellophane*, Bull. Scient. Acad. Roumaine, **29**, 280 (1947).

31. E. MACOVSCHI, ANA JIVĂNESCU, *La branchie artificielle utilisée comme moyen aidant à la recherche de la perméabilité des membranes vivantes. Note. X. La pénétration du violet de méthyle à travers une membrane de l'intestin*, Bull. Scient. Acad. Roumaine **30**, 331 (1948).
32. E. MACOVSCHI, IRINA MARINEANU, *The structure theory, the state of protoplasm water and the problem of plant sap origin*, Rev. roum. biochim, **4**, 235 (1967).
33. E. MACOVSCHI, *La matière vivante et le problème des relations entre médicaments et enzymes*, Rev. roum. biochim. **3**, 321 (1966).
34. E. MACOVSCHI, *The living matter and the relationships between noxious substances and drugs*, Rev. roum. biochim. **5**, *3* (1968).

BIOSTRUCTURE THEORY AND PROBLEM OF SODIUM IONS ACTIVE TRANSPORT IN GIANT AXONS FROM SEPIA

SUMMARY

The biostructure theory permits a new explanation of A. L. Hodgkin's and R. D. Keynes' experimental data concerning sodium ion effluxes from Sepia giant axons loaded with radioactive sodium and immersed in sea water.

Consonant with this explanation this efflux is a diffusion phenomenon occurring in accordance with sodium concentration gradient between axoplasm and sea water and is not a phenomenon of sodium pumping against this gradient.

This explanation is based on some considerations concerning the postulates of membrane and biostructure theories, the mechanism of axon loading with radioactive sodium ions as well as the mechanism of sodium ion efflux from the axon.

These findings suggest new research subjects in the field of cell biochemistry and of electrophysiology.

ST. CERC. BIOCHIM. II, 3,233–237 (1968)

RAPORTUL ANTIGENIC DINTRE PROTEINELE SOLUBILE DIN AXUL EMBRIONAR AL SEMINȚEI ȘI ALTE FORMAȚIUNI ȘI ORGANE ALE PORUMBULUI

VICTORIA ALEXANDRESCU

Rezumat. — Cu ajutorul unui ser imun antiproteină din axul embrionar al seminței de porumb, s-au evidențiat 15 antigene la reacția omologă. Din acestea, 10 sînt comune cu scutelul și 4 cu endospermul. Axul embrionar conține un singur antigen specific. După primele 5—7 zile de la germinație, în axul embrionar se mai găsesc doar 7 antigene din cele pe care el le-a avut în sămînța negerminată; antigenul specific de formațiune s-a metabolizat deja. După germinația seminței, scutelul și endospermul conțin același număr de antigene comune cu axul embrionar ca și înainte de germinație. Frunza, în etapa de plantă cu 4—5 frunze, conține 3 antigene comune cu axul embrionar al seminței.

Într-o lucrare anterioară am arătat că proteinele solubile din axul embrionar al seminței de porumb (*Zea mays*) pot determina formarea de anticorpi. Cu acel prilej am pus în evidență existența a 15 antigene și am arătat că nu s-au putut evidenția antigene caracteristice pentru soiul sau varietatea respectivă de porumb [1.].

Scopul lucrării de față este să stabilească dacă antigenele puse de noi în evidență în reacția omologă (proteine din axul embrionar — ser imun antiax embrionar) sînt specifice formațiunii analizate, sau dacă o parte din ele sînt comune și celorlalte două: scutelul și endospermul. De asemenea, am urmărit dacă antigenele evidențiate se metabolizează imediat sau mai persistă după 5—7 zile de la germinație, cînd mugurașul ajunge la o lungime de 2—6 cm. Am ales această etapă deoarece cercetări anterioare [2, 3] ne-au arătat că în această perioadă, electroforegrama proteinelor diferă de a celor din axul embrionar în repaus sau din frunză. Am mai urmărit apoi dacă frunzele de porumb, în etapa de plantă cu 4—5 frunze, mai conțin antigene identice sau asemănătoare cu cele evidențiate de noi în axul embrionar al seminței de porumb, pentru a vedea dacă în diferitele etape de dezvoltare a porumbului există o continuitate în ceea ce privește antigenele.

MATERIALE ȘI METODE

S-a lucrat cu semințe de porumb din soiul Dobrogean, varietatea indurata. Extracția proteinelor din axul embrionar al seminței de porumb s-a făcut cu soluție tampon de acid boric 0,2 M—borax 0,05 M, pH = 8,2, cu adaos de clorură de sodiu 15 %

1 vol./2 vol.Prepararea antiserului şi metodele folosite sînt date în lucrarea precedentă 1.

Pentru cercetarea antigenelor comune dintre axul embrionar şi celelalte formaţiuni şi organe ale porumbului s-a lucrat cu seruri absorbite. Pentru aceasta, preparatele proteice necesare s-au obţinut folosind acelaşi extractant ca mai sus, în următorul raport: pentru axul embrionar 1 g/15 ml; pentru scutel, înainte şi după germinaţie, 1/8; pentru endosperm, înainte şi după germinaţie, 1/3, iar pentru axul embrionar, după germinaţia seminţei, şi pentru frunze 1/1.

Pentru absorbţia antiserului s-a procedat astfel: la 2 ml ser imun antiproteină din axul embrionar s-au adăugat cantităţi mici (de ordinul mg) din preparatul proteic cu care vrem să-l comparăm. După adăugarea proteinei, serul s-a ţinut o oră la 37°C şi 16 ore la frigider, după care s-a centrifugat 20 min la 4 000 g. S-a încercat prin metoda Ouchterlony dacă serul mai dă linii de precipitare cu proteina cu care s-a făcut precipitarea şi, în caz afirmativ, s-a mai adăugat o cantitate de proteină. Operaţia s-a repetat pînă la precipitarea totală. S-au efectuat imunoelectroforegrame cu proteina extrasă din axul embrionar, pusă în paralel faţă de ser imun antiax embrionar, absorbit şi neabsorbit. Liniile de precipitare care lipseau în partea antiserului absorbit, faţă de cele corespunzătoare antiserului neabsorbit, demonstrau prezenţa antigenelor comune între organul din care ele au fost extrase şi folosite pentru precipitare şi axul embrionar.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Aspectul imunoelectroforegramei proteinelor solubile din axul embrionar al seminţei de porumb, cu antiserul omolog corespunzător, este redat în figura 1. Liniile de precipitare obţinute au fost numerotate de la 1 la 15, începînd de la anod spre catod.

Pentru a stabili dacă există şi care anume sînt antigenele comune între axul embrionar şi celelalte două formaţiuni ale seminţei de porumb — scutelul şi endospermul, — ne-am folosit de serul imun absorbit cu preparat proteic extras din scutel, respectiv din endosperm.

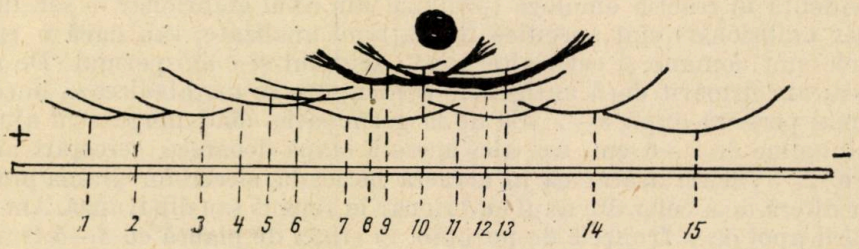


Fig. 1. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din axul embrionar al seminţei de porumb cu serul imun omolog.

Absorbţia serului imun antiax embrionar cu preparat proteic din scutel face ca la analiza imunoelectroforetică să se evidenţieze doar cinci linii de precipitare, şi anume: 5, 7, 9, 10 şi 12. Acest fapt ne arată că celelalte 10 antigene sînt comune acestor două formaţiuni ale seminţei de porumb, fapt dovedit şi prin analiza imunoelectroforetică directă dintre proteina din scutel şi serul imun antiax embrionar, cînd s-a constatat formarea a 10 linii de precipitare (fig. 2).

În cazul absorbţiei serului imun cu preparat proteic din endosperm, la analiza imunoelectroforetică se evidenţiază doar trei linii de precipitare, şi anume : 8, 11 şi 12. Ar reieşi că celelalte 12 antigene sînt comune

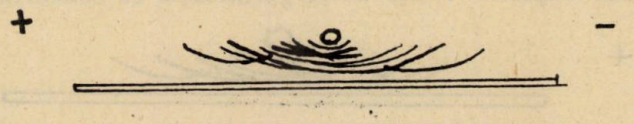


Fig. 2. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din scutel cu serul imun antiax embrionar.

axului embrionar şi endospermului. La analiza imunoelectroforetică directă dintre proteina din endosperm şi serul imun antiax embrionar se obţin patru linii de precipitare (fig. 3). Această neconcordanţă pare să fie datorată impurificării proteinelor din endosperm cu proteina din scutel, care la absorbţia antiserului poate reacţiona cu anticorpii respectivi, pe

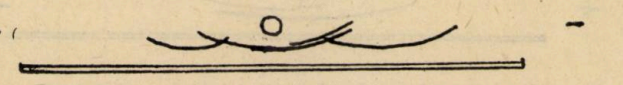


Fig. 3. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din endosperm cu serul imun antiax embrionar.

cînd în reacţia imunoelectroforetică directă cantitatea lor este sub limita de sensibilitate a metodei. Pentru control, am folosit şi absorbţia serului imun antiax embrionar cu extract proteic din scutelul luat împreună cu endospermul. La analiza imunoelectroforetică, antiserul astfel absorbit pune în evidenţă o singură linie de precipitare (linia 12). Din examinarea datelor parţiale prezentate se poate vedea că antigenul 12 este singurul care nu se găseşte nici în scutel, nici în endosperm, fiind deci specific axului embrionar.

În continuare, am urmărit soarta pe care antigenele puse de noi în evidenţă în cele trei formaţiuni ale seminţei o au în alte etape de dezvoltare.

Astfel, prin analiza imunoelectroforetică directă dintre proteina extrasă din axul embrionar după 5—7 zile de la germinaţia seminţei şi antiserul nostru, se observă formarea a şapte linii de precipitare (fig. 4), ceea ce arată că în această etapă se mai găsesc doar şapte antigene comune

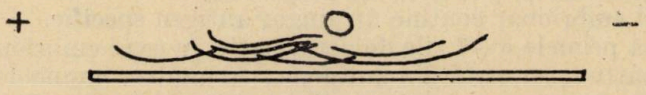


Fig. 4. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din axul embrionar după 5—7 zile de la germinaţia seminţei de porumb cu serul imun antiax embrionar.

cu cele din axul embrionar negerminat. Prin absorbţia antiserului se constată că antigenul specific de formaţiune al axului embrionar este deja metabolizat după acest interval.

Scutelul seminţei prezenta iniţial 10 antigene comune cu cele din axul embrionar, iar după 5—7 zile de la germinaţia seminţei se constată

la analiza imunoelectroforetică directă formarea tot a 10 linii de precipitare (fig. 5).

Endospermul seminței avea patru antigene comune cu cele din axul embrionar, iar după 5—7 zile de la germinație se constată prin analiza

Fig. 5. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din scutel, după 5—7 zile de la germinația seminței, cu serul imun antiax embrionar.

imunoelectroforetică directă că proteina respectivă conține tot patru antigene comune (fig. 6). Aceasta arată că antigenele comune din scutel și endosperm se păstrează și după primele 5—7 zile de la germinație.

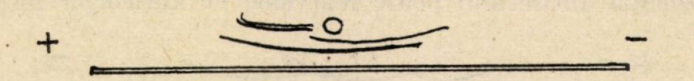


Fig. 6. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din endosperm, după 5—7 zile de la germinația seminței, cu serul imun antiax embrionar.

În sfîrșit, analiza imunoelectroforetică directă dintre proteinele din frunză și antiserul nostru pune în evidență trei linii de precipitare, alungite spre anod (fig. 7). Aceasta arată că între axul embrionar și frunze există trei antigene comune.

Fig. 7. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din frunză, în etapa de plantă cu 4—5 frunze, cu serul imun antiax embrionar.

CONCLUZII

a) Din cele 15 antigene puse în evidență în axul embrionar, 10 sînt comune cu scutelul și patru cu endospermul.

b) Axul embrionar conține un singur antigen specific.

c) După primele 5—7 zile de germinație, în axul embrionar se metabolizează o parte însemnată din antigene; la analiza imunoelectroforetică directă dintre proteinele axului embrionar germinat și serul imun antiax embrionar negerminat se formează șapte linii de precipitare.

d) După germinația seminței, scutelul și endospermul conțin același număr de antigene comune cu axul embrionar ca și înainte de germinație.

e) Frunza, în etapa de plantă cu 4—5 frunze, conține trei antigene identice sau asemănătoare cu cele din axul embrionar al seminței.

Prezentată la redacție la 26 februarie 1968

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. V. Alexandrescu, *Comportarea electroforetică și imunoelectroforetică a proteinelor solubile din germeni și endospermi de porumb*, St. cerc. biochim. **10**, *4*, 301 (1967).
2. V. Alexandrescu, *Localizarea activității amilazei și invertazei pe fracțiunile proteice solubile din semințele de porumb în timpul încolțirii*, St. cerc. biochim. **5**, *3*, 399 (1962).
3. V. Alexandrescu, *Comportement électrophorétique des protéines solubles des feuilles de maïs* Rev. roum. Biochim. **2**, *2*, 115 (1965).

ANTIGENIC CONNECTIONS BETWEEN SOLUBLE PROTEINS OF THE SEED EMBRYONIC AXIS AND OTHER PARTS AND ORGANS OF MAIZE

SUMMARY

15 antigens at the homologous reaction were made evident through an immune antiprotein serum of the embryonic axis of the maize. From these, 10 are common to those of the scutel and 4 to those of the endosperm. The embryonic axis contains a single specific antigen. In the first 5—7 days after germination, in the embryonic axis only 7 antigens of those which it initially had in the ungerminated seed are found; the specific antigen of each part was already metabolized. After seed germination the scutel and the endosperm contain the same number of common antigens to those of the embryonic axis before germination. The leaf, in the stage of plant with 4—5 leaves, contains 3 antigens common to those of the seed embryonic axis.

ST. CERC. BIOCHIM., 11, 3, 239–245 (1968)

COMPORTAREA ELECTROFORETICĂ ŞI IMUNOELECTROFORETICĂ A PROTEINELOR DIN AXUL EMBRIONAR AL SEMINŢEI DE PORUMB DUPĂ GERMINAŢIE

VICTORIA ALEXANDRESCU şi IOANA CĂLIN

Rezumat. — Procesul germinaţiei duce la micşorarea numărului de fracţiuni proteice de la 14 la 7 şi la apariţia unor proteine cu mobilităţi electroforetice mai mari.

Cu ajutorul unui ser imun antiax embrionar, după 5—7 zile de la germinaţie, s-au pus în evidenţă 14 antigene la reacţia omologă. Dintre acestea, 9 sînt comune cu cele din sămînţă (7 cu cele din axul embrionar şi 2 cu cele din scutel), iar restul sînt nou sintetizate. Scutelul conţine 9—10 antigene comune, iar endospermul 4 antigene comune cu cele din axul embrionar germinat. Frunza, în etapa de plantă cu 4—5 frunze, conţine 6 antigene comune cu axul embrionar al seminţei după 5—7 zile de la germinaţie. Nu s-au putut pune în evidenţă diferenţe calitative între soiurile, respectiv varietăţile, cercetate.

Transformările pe care proteinele din sămînţă le suferă în pro germinaţiei nu sînt încă bine cunoscute. Problema relaţiei dintre procesele hidrolitice şi cele de sinteză a proteinelor, care au loc în primele zile ale dezvoltării axului embrionar, este încă discutată [1], [2].

În lucrări anterioare am caracterizat proteinele solubile din axul embrionar al seminţei de porumb în repaus şi după 4—10 zile de la germinaţie, prin electroforeză pe hîrtie [3], [4]. Recent [5], [6], am studiat comportarea electroforetică şi imunoelectroforetică a proteinelor solubile din axul embrionar al seminţei de porumb şi raportul antigenic cu alte formaţiuni şi organe ale porumbului.

Cercetarea în continuare a proteinelor din plante în procesul germinaţiei, pe cale imunoelectroforetică, cu un ser imun antiproteină din formaţiunea respectivă, după germinaţie, ar putea aduce date preţioase cu privire la procesele hidrolitice şi cele de sinteză *de novo* a proteinelor cu caracter antigenic, care au loc în această perioadă, cu atît mai mult cu cît lucrări de acest gen nu am găsit în literatură.

În lucrarea de faţă s-au caracterizat proteinele solubile din axul embrionar al seminţei, după 5—7 zile de la germinaţie, prin metoda electroforetică şi cea imunoelectroforetică în gel de agar. Totodată, s-a urmărit compararea acestor caractere la proteinele extrase din seminţe care fac parte din varietăţi diferite, pentru a vedea dacă în această etapă de dezvoltare putem pune în evidenţă caractere specifice varietăţii. Cu ajuto-

rul serului imun antiax embrionar, după germinația semințel, s-au evidențiat antigenele comune cu cele din alte formațiuni.

MATERIALE ȘI METODE

S-a lucrat pe semințe de porumb Românesc de Studina, din varietatea indurata, și ICAR—54, din varietatea indentata. Semințele au fost în prealabil îmbibate cu apă de robinet, care a conținut 1‰ formol, și s-au lăsat să încolțească la întuneric, la temperatura camerei, în cutii Petri. După 5—7 zile de la germinație, cînd mugurașul a ajuns la 2—6 cm lungime, s-a separat împreună cu rădăcina embrionară și cele secundare. Extragerea proteinelor solubile s-a făcut în soluție tampon de acid boric 0,2 M-borax 0,05 M pH = 8,2, cu soluție de clorură de sodiu 15% în proporție de 1 vol./2 vol., raportul de extracție fiind de 1 g material/1 ml amestec extractant [5]. Extracția proteinelor din celelalte formațiuni sau organe ale porumbului s-a făcut prin aceeași metodă, folosind însă raporturi diferite între material și extractant [6]. Preparatele liofilizate din formațiunile semințel negerminate conțineau 50—60% proteină, cele din semințe după 5—7 zile de germinație 30—35%, iar extractele din frunză 70%.

Electroforeza în gel de agar și imunoelectroforeza s-au efectuat după micrometoda Scheidegger [7], folosind tamponul acid succinic 0,013 M — hidroxid de sodiu 0,0224 M, cu adaos de fosfat disodic M/60 vol./vol., pH final = 8,4, gelul de agar fiind preparat în același tampon, diluat cu apă distilată în raportul 1 : 2. Timpl de migrare a fost de 1 oră și 45 de minute pentru electroforeză și 2 ore și 15 minute în cazul imunoelectroforezei. După ce s-a adăugat antiserul, plăcile s-au ținut două zile în camera umedă, pentru difuzie.

Prepararea antiserurilor. Pentru fiecare din cele două soiuri de porumb cercetate, care fac parte din varietăți diferite, s-au injectat cîte doi iepuri cu extract proteic proaspăt preparat, la care s-a adăugat clorură de sodiu cristale, pentru a avea concentrația serului fiziologic. S-au adăugat hidroxid de aluminiu ca adsorbant și adjuvant al antigenelor și penicilină și streptomicină ca sterilizanți. Imunizarea s-a făcut cu aproximativ 200 mg proteină/animal, fracționată în 10 doze crescînde, la interval de 4—6 zile. Titrul precipitant al serurilor a fost de 1,8 μg/ml antigen și s-a făcut prin metoda Uhlenhut.

Pentru cercetarea antigenelor comune între varietățile de porumb luate în studiu s-a lucrat cu seruri absorbite [6].

S-au efectuat imunoelectroforeze de control și s-a constatat că serul sanguin de iepure nu dă linii de precipitare cu antigenele din axul embrionar al semințel de porumb după germinație.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Electroforeza în gel de agar. În condițiile noastre de lucru, după 5—7 zile de la germinație, proteinele solubile din axul embrionar al semințel de porumb s-au separat în șapte fracțiuni, din care patru repartizate în regiunea anodică și trei în regiunea catodică a plăcii de agar (fig. 1).

Urmărirea în paralel a migrării amidonului, alături de proteina noastră, arată că final amidonul se găsește dincolo de fracțiunea proteică și este reprezentat în schema noastră printr-o linie punctată (punct 0 de migrare). Aceasta arată că toate proteinele evidențiate din extractul nostru sînt încărcate electronegativ.

Separarea în gel de agar a proteinelor solubile din axul embrionar al seminței de porumb negerminate a pus în evidență 14 fracțiuni, din care șapte repartizate în regiunea anodică și 7 în regiunea catodică [5].

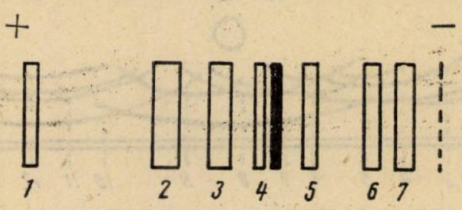


Fig. 1. — Electroforeza în gel de agar a proteinelor solubile din axul embrionar al seminței de porumb după 5—7 zile de la germinație

Se constată că procesul germinației duce la micșorarea numărului de fracțiuni proteice, de la 14 la 7, și la apariția unor proteine cu mobilități electroforetice mai mari (fracțiunile 1 și 2), după cum reiese din tabela 1.

Tabela 1

Mobilitatea fracțiunilor proteice din axul embrionar al seminței de porumb
(x = valoarea dată în tabelă)

Înainte de germinație		Între a 5-a și a 7-a zi de la germinație	
nr. fracțiunii	mobilitatea $x \cdot 10^{-5}$ cm²/s/V	nr. fracțiunii	mobilitatea $x \cdot 10^{-5}$ cm²/s/V
1	2,64	1	4,40
2	2,10	2	2,80
3—7	1,81—1,37	3	2,30
8	1,20	4	2,00
9	1,06	5	1,40
10	0,79	6	0,75
11	0,62	7	0,38
12	0,52		
13	0,41		
14	0,27		

Concluzii asemănătoare au reieșit dintr-o cercetare anterioară [4], în care aceleași proteine s-au studiat pin electroforeza pe hîrtie.

Proteinele extrase din cele două soiuri de porumb, care aparțin la două varietăți diferite, nu prezintă diferențe ale mobilității electroforetice pentru fracțiunile evidențiate de noi. De altfel, acest lucru l-am constatat și în cazul proteinelor din axul embrionar al seminței de porumb în repaus, din soiuri și varietăți diferite [5].

Imunoelectroforeza proteinelor solubile. Aspectul imunoelectroforegramei proteinelor solubile cu antiserul omolog corespunzător este redat în figura 2.

Se constată formarea a 14 linii de precipitare, repartizate în zona anodică și în cea catodică a plăcii, numerotate de la anod spre catod de la 1 la 14.

Pentru a vedea identitatea sau diferenţierea din punct de vedere imunochimic între proteinele solubile din axul embrionar al seminţei de porumb, după 5—7 zile de la germinaţie, la cele două varietăţi de porumb

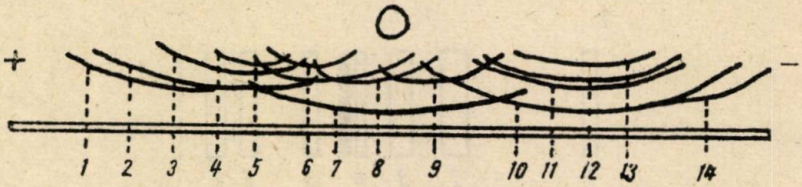


Fig. 2. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din axul embrionar al seminţei de porumb după 5—7 zile de la germinaţie cu serul imun omolog.

cercetate, s-a lucrat prin reacţii încrucişate şi prin analiza imunoelectroforetică cu seruri absorbite. Nu s-au putut pune în evidenţă antigene caracteristice de varietate prin nici una din metodele folosite.

Într-o lucrare anterioară am pus în evidenţă în axul embrionar al seminţei de porumb 15 antigene. Problema care se ridica era dacă antigenele evidenţiate în axul embrionar al seminţei în repaus sînt aceleaşi cu cele evidenţiate în lucrarea de faţă, după 5—7 zile de la germinaţie. Pentru aceasta, am urmărit formarea liniilor de precipitare între proteina axului embrionar al seminţei şi antiserul nostru, evidenţiind şapte linii de precipitare (fig. 3). Aceasta arată că, dintre cele 14 antigene pe care axul embrionar le conţine după 5—7 zile de la începutul germinaţiei, şapte

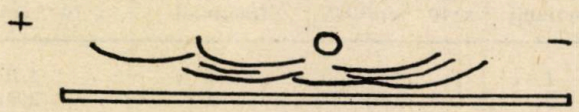


Fig. 3. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din axul embrionar al seminţei cu serul imun antiax embrionar după 5—7 zile de germinaţie.

antigene au fost prezente în el şi înainte de germinaţie, iar restul de şapte sînt sintetizate de *novo* sau migrate din celelalte formaţiuni în acest interval de timp.

În continuare, am urmărit înrudirea antigenelor puse în evidenţă în axul embrionar după 5—7 zile de la germinaţie cu cele din scutelul şi endospermul seminţei în repaus.

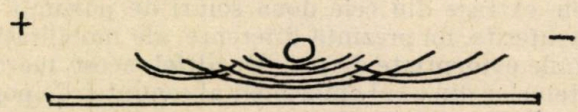


Fig. 4. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din scutelul seminţei cu serul imun antiax embrionar după 5—7 zile de la germinaţie.

Analiza imunoelectroforetică a proteinelor din scutelul seminţei cu serul imun antiax embrionar germinat duce la formarea a nouă linii de precipitare (fig. 4). Faptul că axul embrionar al seminţei conţine numai

șapte antigene comune cu cele din antiserul nostru ne îndreptățește să afirmăm că două antigene din scutelul seminței migrează în axul embrionar, care crește, sau că țesutul axului embrionar are acum proprietatea de a le sintetiza.

Analiza imunoelectroforetică directă a proteinelor din endospermul seminței de porumb cu antiserul nostru a pus în evidență patru linii de pre-

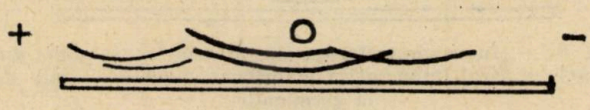


Fig. 5. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din endospermul seminței cu serul imun antiax embrionar după 5—7 zile de la germinație.

cipitare (fig. 5). De altfel, în lucrarea precedentă s-a ajuns la același rezultat [6], ceea ce arată că endospermul conține patru antigene comune cu axul embrionar al seminței în repaus, cît și după germinație, și anume din cele care nu s-au metabolizat în primele șapte zile.

De asemenea, ne-a interesat dacă antigenele puse de noi în evidență sînt răspîndite și în celelalte formațiuni, adică în scutelul și endospermul seminței, în aceeași etapă de dezvoltare. Prin analiza imunoelectroforetică directă între proteina din scutel și antiserul nostru, se observă formarea a 10 linii de precipitare, ceea ce arată existența a 10 antigene comune (fig. 6).

Față de scutelul seminței, care avea nouă antigene comune, constatăm că în primele 5—7 zile de la începerea germinației putem pune în

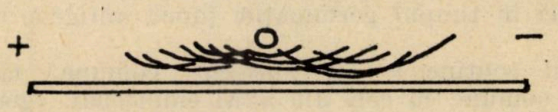


Fig. 6. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din scutel după 5—7 zile de la germinația seminței cu serul imun antiax embrionar în aceeași etapă de creștere.

evidență un antigen nou, comun cu axul embrionar germinat; nu este exclus însă ca preparatul nostru proteic din scuteli să fie impurificat cu urme din axul embrionar, lucru posibil la separarea formațiunilor seminței,

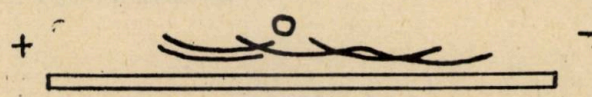


Fig. 7. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din endosperm după 5—7 zile de la germinația seminței cu serul imun antiax embrionar în aceeași etapă de creștere.

obținîndu-se astfel o linie de precipitare corespunzătoare axului embrionar germinat.

Analiza imunoelectroforetică directă între proteina din endosperm și antiserul nostru arată că se formează patru linii de precipitare (fig. 7).

În sfîrșit, s-a urmărit dacă frunzele de porumb, în faza de plantă cu 4—5 frunze, conțin antigene comune cu cele prezente în antiserul

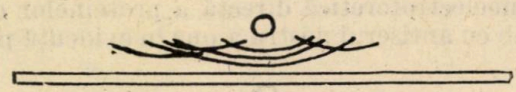


Fig. 8. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din frunză cu serul imun antiax embrionar după 5—7 zile de la germinație.

nostru. Analiza imunoelectroforetică directă între proteina din frunză și antiserul nostru a pus în evidență formarea a șase linii de precipitare (fig. 8).

CONCLUZII

a) Proteinele solubile din axul embrionar al seminței de porumb după 5—7 zile de la germinație se separă prin electroforeza în gel de agar în șapte fracțiuni.

b) Procesul germinației duce la micșorarea numărului de fracțiuni proteice și la apariția unor proteine cu mobilități electroforetice mai mari.

c) S-au pus în evidență 14 antigene în axul embrionar al seminței de porumb după 5—7 zile de la începerea germinației.

c) Din cele 14 antigene evidențiate, șapte se găsesc și în axul embrionar al seminței, iar restul sînt fie sintetizate în această perioadă, fie transportate aici în timpul germinației (două antigene din scutelul seminței).

e) Scutelul conține 9—10 antigene comune, iar endospermul patru antigene comune cu cele din axul embrionar germinat.

f) Frunza, în etapa de plantă cu 4—5 frunze, conține șase antigene comune cu cele din axul embrionar după 5—7 zile de la germinație.

g) Prin electroforeza sau prin absorbția încrucișată (a anticorpilor cu proteinele solubile din axul embrionar al seminței de porumb, după 5—7 zile de la germinație, nu s-au putut pune în evidență diferențe calitative între varietățile de porumb cercetate.

Prezentată la redacție la 15 aprilie 1968

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. A. Marcus, J. Feeley, *Protein synthesis in imbibed seeds. II. Polysome formation during imbibition*, J. biol. Chem. **240**, 1675 (1965).
2. A. Marcus, J. Velasco, *Enzymes of the glyoxylate cycle in germinating peanuts and castor beans*, J. biol. Chem. **235**, 563 (1960).
3. V. Alexandrescu, *Localizarea activității amilazei și invertazei pe fracțiunile proteice solubile din semințele de porumb*, St. cerc. biochim. **5**, *1*, 7 (1962).

4. V. Alexandrescu, *Localizarea activității amilazei și invertazei pe fracțiunile proteice solubile din semințele de porumb în timpul încolțirii*, St. cerc. biochim. **5**, *3*, 399 (1962).
5. V. Alexandrescu, *Comportarea electroforetică și imunoelectroforetică a proteinelor solubile din germenii și endospermii de porumb*, St. cerc. biochim. **10**, *4*, 301 (1967).
6. V. Alexandrescu, *Raportul antigenic dintre proteinele solubile din germenul seminței și alte formațiuni și organe ale porumbului*, St. cerc. biochim. **11**, (1968).
7. J. J. Scheidegger, *Une micro-méthode de l'immunoélectrophorése*, Int. Arch. Allergy **7**, 103 (1955).

ELECTROPHORETIC AND IMMUNOELECTROPHORETIC BEHAVIOUR OF PROTEINS OF THE EMBRYONIC AXIS OF THE MAIZE SEED AFTER GERMINATION

SUMMARY

The germination process leads to the decrease of the proteic fractions number from 14 to 7 and to the appearance of some proteins with greater electrophoretic mobilities.

5—7 days after germination, and through an immune antiembryonic axis serum 14 antigens at the homologous reaction were made evidet. Among them 9 are common to those of the seed (7 to those of the embryonic axis and 2 to those of the scutel) and the remainder ones are new synthesized.

The scutel contains 9—10 common antigens and the endosperm 4 antigens common to those of the germinated embryonic axis. The leaf, in the stage of plant with 4—5 leaves, contains 6 antigens common to those of the seed embryonic axis 5—7 days after germination. Qualitative variations between the searched sorts, respectively varieties, could not be determined.

ST. CERC. BIOCHIM., 11, 3, 247–253 (1968)

IZOPEROXIDAZELE DIN MAZĂRE (*PISUM SATIVUM*) ÎN CURSUL GERMINAȚIEI

LILICA BOTOȘĂNEANU

Rezumat. — S-au evidențiat, prin electroforeză în agaroză, izoperoxidazele din extractele proteice ale diferitelor formațiuni din semințele de mazăre, în primele zile ale germinației. S-au constatat diferențe între numărul izoenzimelor existente în formațiunile axului embrionar și ale cotiledoanelor încă din primele 24 ore de germinație. După 3 zile de germinație s-au putut evidenția practic toate izoenzimele pe care embrionul le conține și după 7 zile de germinație. S-au găsit diferențe organo-specifice care se referă la numărul, mobilitatea electroforetică și intensitatea de colorare a unor fracțiuni.

Lucrări recente descriu eterogenitatea moleculară a peroxidazelor din diferite materiale vegetale : muguri, frunze și rădăcini de petunii [1], teci de frunze de porumb [2], [3], frunze de tutun [4], varză [5], rădăcini, hipocotil și cotiledon de dovleci [6], noduli radiculari ai diferitelor plante leguminoase [7], frunze de tomate [4], frunze de fasole [4], [8], diferite părți ale plantei de mazăre [4], [9], [10], rădăcini de hrean [4], [11], [12] etc. Pe lîngă eterogenitatea electroforetică, s-a putut constata că peroxidazele prezintă și o eterogenitate catalitică [12], manifestată prin proprietăți fizico-chimice și compoziție diferite.

Apariția și activitatea unor izoperoxidaze în plante s-a dovedit a fi legată de anumite funcții biologice, cum ar fi reacția de apărare împotriva bolilor [8], creșterea plantelor [2], [3] etc., însă rolul complex pe care aceste izoenzime îl au în metabolismul plantelor încă nu este clar. Lucrările relativ numeroase care cercetează eterogenitatea moleculară a peroxidazei au, de aceea, și scopul de a da o semnificație biochimică și fiziologică multiplelor forme ale acesteia.

Se știe că o dată cu imbibarea cu apă a semințelor și începerea germinației au loc și se intensifică o serie de procese biochimice complexe, ca respirația, fotosinteza, sinteza de proteine, de lipide etc. [13], [14], [15], care au la bază o activitate enzimatică intensă. În general, activitatea enzimelor crește în timpul germinației [13], [16], [17], [18], [19]. Sînt însă și enzime la care activitatea scade, dispărînd sau reapărînd în plante, așa cum s-a dovedit în germinația orzului [20]. Formele moleculare ale diferitelor enzime au fost însă puțin cercetate în cursul procesului de germinație ; de obicei, ele au fost puse în evidență după 5 — 6 zile de germinație în cotiledoane și în axul embrionar, cînd acesta își avea organele bine dezvoltate [10], [21]. De aceea, ne-am propus să urmărim existența

și apariția izoperoxidazelor în cursul acestui proces care prezintă aspecte biochimice și enzimologice interesante.

MATERIAL ȘI METODE

Semințe de mazăre, hibridul F 53—54*, înmuiate cîteva ore în apă, au fost puse la germinat pe hîrtie de filtru, în cutii Petri, în laborator, la temperaturi cuprinse între 20—25°C.

S-au determinat izoperoxidazele după 1, 2, 5 și 7 zile de germinație, în modul următor: la o zi, în extractele proteice din axul embrionar și, separat, din cotiledoane; la 3 zile separat, din axul embrionar fără rădăcină, din rădăcină și din cotiledoane, iar la 5 și 7 zile, separat, din frunze, tulpină, rădăcină și cotiledoane.

Extractul proteic s-a obținut prin majorarea la rece a materialului vegetal cu mici cantități de apă, și anume: cu 1/5 din greutatea acestuia după 1 și 3 zile de germinație, și cu 1/4 după 5 și 7 zile de germinație. Extractul proteic astfel obținut s-a centrifugat 20 minute la 16 000 g. Pentru electroforeză s-a folosit supernatantul proaspăt, diluat cu tamponul folosit la prepararea gelului (3 părți supernatant și o parte tempon) numai la materialul provenit din semințe germinate 5 și 7 zile, care au o activitate enzimatică crescută.

S-a lucrat pe gel de agaroză (L'industrie Biologique Française) 1% în tampon TRIS-(0,5 M)-EDTA (0,021 M)-acid boric (0,075 M) pH 7,8 [22] diluat, la o parte tampon adăugîndu-se două părți de apă distilată. Gelul a fost aplicat pe plăci de sticlă de 4 × 8 cm, în care s-au decupat două șanțuri alăturate, pentru două probe diferite sau pentru repetiții, avînd un spațiu de migrare de 5 cm spre anod și 3 cm spre catod. În șanț s-a introdus un amestec în părți egale de extract proteic și de gel.

Electroforeza s-a efectuat în tampon TRIS (0,5 M)-EDTA (0,021 M)-acid boric (0,075 M) pH 7,8, timp de o oră și 45 minute, la 18 V/cm, și 1,2—1,5 mA/cm.

Evidențierea izoperoxidazelor s-a făcut cu reactivul NADI [22], alcătuit dintr-un amestec echimolecular de α-naftol și p-fenilendiamină, cu apă oxigenată în mediu de acid acetic. Imersarea gelului în soluția cu substrat proaspăt preparat a durat 5—10 minute. Enzimogramele au fost estimate vizual și desenate. În paralel, pentru o parte din probe s-a folosit ca substrat benzidina [7], cu care s-au obținut fracțiuni mai difuze decît cu reactivul NADI, în special în regiunea anodică.

Cînd a fost cazul, fracțiunile proteice s-au evidențiat prin colorare cu amidoschwarz.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Enzimogramele din fig. 1 reprezintă izoperoxidazele evidențiate în extractele proteice din axul embrionar (a) și din cotiledoane (b) după 24 de ore de germinație. Fracțiunile 4 și 5 din extractul proteic al axului embrionar apar uneori neseparate.

Rezultatele experiențelor efectuate după 3 zile de germinație, cu extracte proteice din axul embrionar fără rădăcină (a) (la această vîrstă gemula nu se poate separa de tulpină), din rădăcină (b) și din cotiledoane (c), sînt reprezentate în fig. 2.

După 5 zile de germinație, axul embrionar avîndu-și organele bine dezvoltate, s-au putut evidenția izoperoxidazele din extractul proteic de: frunze (a), tulpină (b), rădăcină (c) și cotiledoane (d) (fig. 3).

După 7 zile de germinație, aspectul enzimogramelor este asemănător cu cel obținut după 5 zile de germinație și arătat în fig. 3.

* Soi autohton creat la ICCPT Fundulea.

Ca aspect general enzimogramele obținute prezintă cîteva caractere comune. Fracțiunile din regiunea catodică sînt mai bine conturate decît cele din regiunea anodică, în special la fracțiunile care se separă din extractul proteic al cotiledoanelor. În cazul acesta, evidențierea izo-

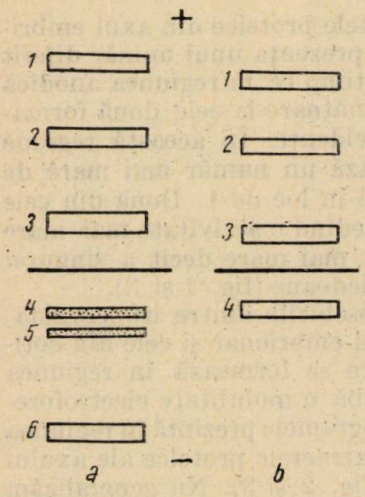


Fig. 1. — Fracțiunile izoperoxidazice evidențiate după 24 ore de germinație în extractele proteice din : a — axul embrionar, b — cotiledoane.

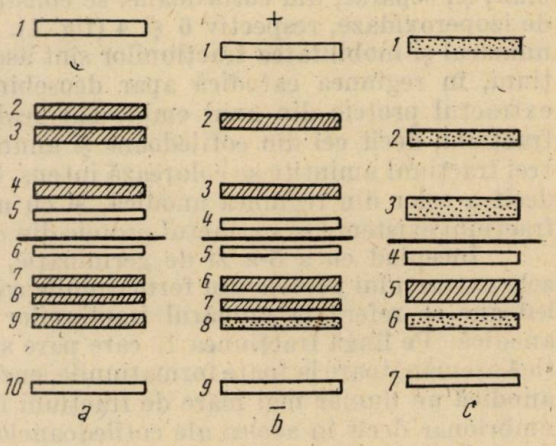


Fig. 2. — Fracțiunile izoperoxidazice evidențiate după 3 zile de germinație în extractele proteice din : a — axul embrionar fără rădăcină ; b — rădăcină și c — cotiledoane.

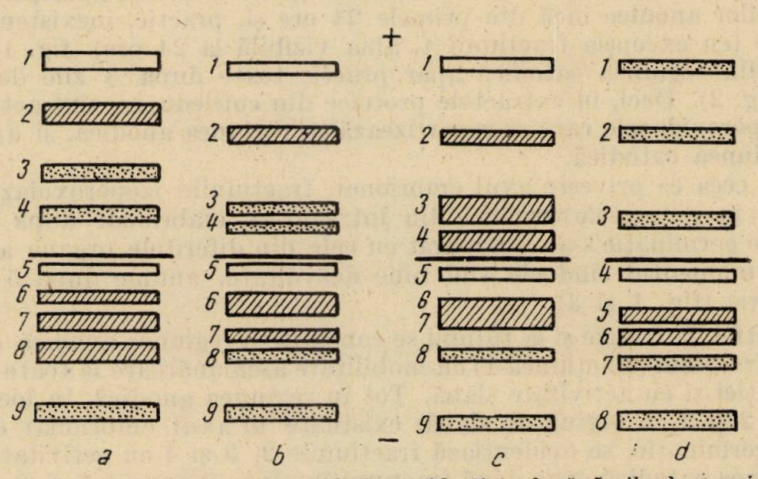


Fig. 3. — Fracțiunile izoperoxidazice evidențiate după 5 zile de germinație în extractele proteice din : a — frunze, b — tulpină, c — rădăcină și d — cotiledoane.

peroxidazelor din regiunea anodică este îngreuiată probabil de prezența în cantitate mare a leguminei și vicilinei etalate în această zonă, care ar putea interfera cu reacția de evidențiere. Dăm în fig. 4 o proteinogramă

obținută cu extracte proteice din cotiledoane (b), în comparație cu cea din axul embrionar (a), după două zile de germinație (fig. 4).

Comparînd rezultatele obținute în cursul celor 7 zile de germinație a semințelor de mazăre, s-au putut face unele constatări în legătură cu existența și apariția izoperoxidazelor.

După 24 de ore de germinație, în extractele proteice din axul embrionar, și, separat, din cotiledoane, se constată prezența unui număr diferit de izoperoxidaze, respectiv 6 și 4 (fig. 1). În timp ce în regiunea anodică numărul și mobilitatea fracțiunilor sînt asemănătoare la cele două formațiuni, în regiunea catodică apar deosebiri evidente. În această regiune extractul proteic din axul embrionar realizează un număr mai mare de fracțiuni, decît cel din cotiledoane și anume 3 în loc de 1. Două din cele trei fracțiuni amintite se colorează intens, dovedind o activitate mai mare decît a celor din regiunea anodică, și cu mult mai mare decît a singurei fracțiuni existente în extractul proteic din cotiledoane (fig. 1 și 3).

Începînd cu a 3-a zi de germinație, deosebirile dintre izoperoxidazele extractului proteic din formațiunile axului embrionar și cele din cotiledoane se referă la numărul fracțiunilor care se formează în regiunea anodică. Pe lîngă fracțiunea 1, care pare să aibă o mobilitate electroforetică asemănătoare la toate formațiunile, enzimogramele prezintă în regiunea anodică un număr mai mare de fracțiuni în extractele proteice ale axului embrionar decît în acelea ale cotiledoanelor (fig. 2 și 3). Nu generalizăm această observație și la fracțiunile din regiunea catodică, deoarece fracțiunea 5 de la cotiledoane pare a fi formată din două fracțiuni unite, care se separă după încă două zile de germinație (fig. 2).

Comparînd între ele enzimogramele realizate cu extracte proteice din cotiledoane la diferite zile ale germinației, constatăm apariția tuturor fracțiunilor anodice încă din primele 24 ore și, practic, inexistența celor catodice (cu excepția fracțiunii 4, abia vizibilă la 24 ore) (fig. 1). Fracțiunile din regiunea catodică apar practic toate după 3 zile de germinație (fig. 2). Deci, în extractele proteice din cotiledoane sînt active mai întîi izoperoxidazele care se repartizează în regiunea anodică, și apoi cele din regiunea catodică.

În ceea ce privește axul embrionar, fracțiunile izoperoxidazice evidențiate în extractele proteice din întregul ax embrionar după primele 24 ore de germinație s-au comparat cu cele din diferitele organe ale acestuia în momentul cînd ele sînt bine dezvoltate, anume după 5 zile de germinație (fig. 1 și 3).

Astfel, la frunze și la tulpini se constată în regiunea anodică existența unei fracțiuni (fracțiunea 1) cu mobilitate asemănătoare la toate vîrstele germinației și cu activitate slabă. Tot în regiunea anodică, în locul fracțiunilor 2 și 3 cu activitate slabă, existente în axul embrionar după 24 ore de germinație, se evidențiază fracțiunile 2, 3 și 4 cu activitate mare. În regiunea catodică apar două fracțiuni în plus, și anume 5 și 8.

Rădăcinile s-au putut separa în a treia zi de germinație și s-a putut observa încă de la această vîrstă existența tuturor fracțiunilor pe care le găsim și după 5 și 7 zile de germinație. În comparație cu extractele proteice din axul embrionar după 24 ore de germinație, (fig. 1) cele din rădăcini prezintă, în locul fracțiunilor 2 și 3, un număr de trei fracțiuni, și anume 2, 3 și 4, cu activitate mare, și fracțiunile 5 și 8 în plus în re-

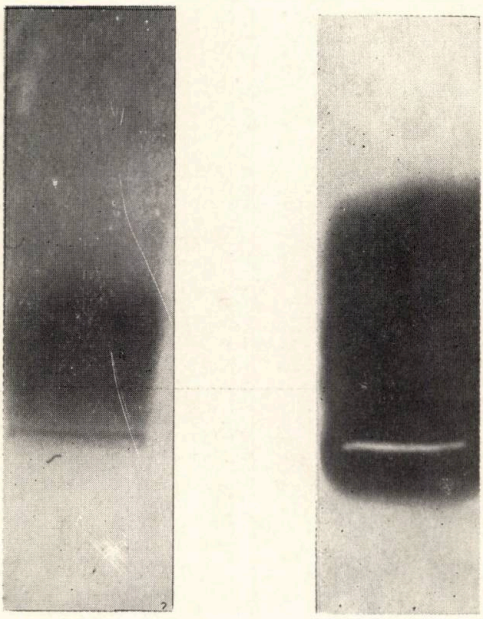


Fig. 4. — Proteinogramele obținute cu extracte proteice din axul embrionar (a) și cotiledoane (b) după 2 zile de germinație.

giunea catodică. Fracțiunile 7 și 8 au o mobilitate electroforetică asemănătoare și activitate mare și, de aceea, probabil, apar unite la a 5-a zi de germinație (fig. 3).

În general, se poate spune că, încă din primele 24 ore ale germinației, în extractele proteice din axul embrionar, ca și în cele din cotiledoane, se pot evidenția o bună parte din izoperoxidazele existente după 5 zile de germinație. Aceasta dovedește că ele se activează sau se sintetizează încă din primele ore ale germinației și se poate pune în legătură cu constatarea că, la semințele de mazăre în germinație, în primele 12 ore se produce o rapidă creștere a respirației [14].

Comparînd enzimogramele extractelor proteice din diferitele organe ale embrionului după 5 zile de germinație (fig. 3), constatăm anumite diferențe, în special în regiunea anodică. Ele se referă la mobilitatea electroforetică a fracțiunilor 2, 3 și 4 ale extractelor proteice din frunze, tulpini și rădăcini, și 2 și 3 din cotiledoane, precum și la intensitatea de colorare a acestor fracțiuni. În afară de cotiledoane, la care toate fracțiunile anodice par a avea aceeași intensitate de colorare, la celelalte organe fracțiunea 1 este cel mai slab, iar 2 cel mai intens colorată. La rădăcini, intensitatea de colorare, și deci și activitatea izoperoxidazică, este foarte intensă și se referă și la fracțiunile 3 și 4. În regiunea catodică sînt intens colorate fracțiunile 6, 7 și 8 de la frunze, 6 și 7 de la tulpini și 5 și 6 de la cotiledoane.

Este interesant de menționat faptul că, după bulele de oxigen care se formează în regiunea anodică aproape de start, se constată diferențe organo-specifice și la nivelul catalazei. Ne referim la catalazele care se pot evidenția la o concentrație mică de apă oxigenată (0,1% ml perhidrol) și care apar sub forma unor benzi late de 1—1,5 cm la frunze, de 0,5—0,75 cm la cotiledoane, mai redusă la tulpini și practic inexistentă tocmai la rădăcini, unde activitatea izoperoxidazelor e cea mai intensă. La frunze, din cauza bulelor de oxigen care se formează în momentul cînd se evidențiază izoperoxidazele, măsurarea mobilității fracțiunilor 2 și 4 este îngreuiată.

Lucrări apărute în ultimele luni menționează existența diferențelor organo-specifice la nivelul izoperoxidazelor, de ex. la dovleci [6] și chiar la mazăre [10]. După unii autori [10], ele s-ar datora unei dezvoltări intracelulare diferite, și anume formării diferite a formațiunilor intracelulare care nu sînt uniform repartizate în plantă. Aceste diferențe la nivelul izoenzimelor ar putea să constituie reflectarea unor cauze care duc la diferențierea organismului.

După intensitatea de colorare a fracțiunilor izoperoxidazice, care crește de la prima la a 3-a zi de germinație, și care ne-a obligat după 5 zile de germinație să diluăm toate extractele, s-ar putea deduce o creștere a activității peroxidazice în perioada de germinație analizată. La mazărea în curs de germinație s-au găsit și alte enzime a căror activitate crește, cum ar fi fosfataza și amilaza [17].

CONCLUZII

Între enzimogramele obținute cu extracte proteice din axul embrionar și cele din cotiledoane sînt diferențe care se referă la numărul și la intensitatea de colorare a fracțiunilor. Primele prezintă un număr de frac-

țiuni mai mare decît la cotiledoane, încă din primele 24 ore ale germinației în regiunea catodică, iar după 3 zile în regiunea anodică.

Extractele proteice din cotiledoane posedă toate fracțiunile din regiunea anodică după 24 ore de germinație; fracțiunile din regiunea catodică apar practic toate din prima și a 3-a zi de germinație.

Formațiunile axului embrionar prezintă în primele 24 ore ale germinației o bună parte din fracțiunile izoperoxidazice, și anume 6 din 9. Ele apar practic toate după 3 zile de germinație, însă pot fi evidențiate după 5 zile de germinație, cînd gemulele se pot separa de tulpini.

Între enzimogramele pe care le dau extractele proteice din diferite organe ale embrionului după 5 zile de germinație există diferențe care se referă atît la numărul fracțiunilor cît și la mobilitatea electroforetică și la intensitatea de colorare a unor fracțiuni, în special din regiunea anodică.

Prezentată la redacție la 15 aprilie 1968

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. D. Hess, *Multiple Formen der Phenolase und Peroxydase in reinen Linien von Petunia*, Z. Pflanzenphysiol. **56**, 295 (1967).
2. D. C. McCune, *Multiple Peroxidases in Corn*, Ann. N. Y. Acad. Sci. **94**, 723 (1961).
3. A. W. Galston, D. C. McCune, *The Effects of GA on peroxidases in dwarf Peas and Corn*, Plant Growth Regulation, Forth International Conference, Iowa State (1961), p. 616.
4. V. Macko, A. Novacky, *The study of plant peroxidase isoenzymes by means of disk electrophoresis on acrylamide gel*, Biologia (Bratislava) **21**, 128 (1966).
5. J. Chmielnicka, *Badania nad peroksydaza kapusty (Studies on cabbage peroxidase)*, Acta Polin. Pharmac. **22**, 537 (1965).
6. M. Dvorak, J. Cernohorska, *Peroxidases of different parts of the pumpkin plant (Cucurbita pepo L.)*, Biol. Plant. (Praha) **9**, 300 (1967).
7. E. Moustafa, *Peroxidase isoenzymes in root nodules of various leguminous plants*, Nature, 1189 (1963).
8. G. L. Farkas, M. A. Stahmann, *On the nature of changes in peroxidase isoenzymes in bean leaves infected by southern bean mosaic virus*, Phytopathology **56**, 669 (1966).
9. R. Ockorse, B. Z. Siegel, A. W. Galston, *Hormone induced repression of a peroxidase isoenzyme in plant tissue*, Science **151**, 452 (1966).
10. B. Z. Siegel, A. W. Galston, *The isoperoxidases of Pisum sativum*, Plant. Physiol. **42**, 221 (1967).
11. M. Shannon, B. Kay, J. Y. Lew, *Peroxidase isoenzymes from horseradish roots*, J. biol. Chem. **241**, 2166 (1966).
12. E. Kay, L. M. Shannon, J. Y. Lew, *Peroxidase isoenzymes from horseradish roots. II. Catalytic properties*, J. biol. Chem. **242**, 2470 (1967).
13. A. M. Altschul, L. Y. Yatsu, R. L. Ory, E. M. Engleman, *Seed proteins*, Ann. rev. Plant Physiol. **17**, 113 (1966).
14. F. S. Steward, *Plant physiology*, Academic Press, New York—London, 1965, p. 246.
15. V. Gheție, *An hypothesis on the mechanism of reserve proteins hydrolysis during seed germination*, Rev. roum. Biochim. **4**, 353 (1966).
16. J. H. Cherry, *Protein bodies, nucleic acids and enzymes of peanut cotyledons: changes on germination*, Chem. Abstr. *60*, 4469 d (1964).
17. A. M. Firenzuoli, P. Vanni, E. Masronuzzi, *Enzymic levels during germination and differentiation in Pinus pinea and Pinus pinaster*, Chem. Abstr. **65**, 14110 d (1966).
18. J. Lowell Young, J. E. Varner, *Enzyme synthesis in the cotyledons of germinating seeds*, Arch. Biochem. Biophys. **84**, 71 (1959).
19. Hyun Yue See, Soo Yo Kim, Keun Bai Lee, *Study on the glyoxylate cycle in germinating sesame seed embryos*, Arch. Biochem. Biophys. **107**, 479 (1964).

20. E. Latzko, J. P. Kotze, *Enzymic model of germinating summer barley*, Chem. Abstr. **62**, 13524 h (1965).
21. O. Frydenberg, G. Nielsen, *Amylase isoenzymes in germinating barley seeds*, Hereditas, **54**, 123 (1965).
22. T. Aronsson, A. Grönwall, *Improved separation of serum proteins in paper electrophoresis. A new electrophoresis buffer*, Scand. J. Clin. Lab. Invest. **9**, 338 (1957).
23. J. Uriel, *Characterization of enzymes in specific immuneprecipities*, — Ann. N. Y. Acad. Sci. **103**, 956 (1963).

PEA (*PISUM SATIVUM*) ISOENZYMES DURING GERMINATION

SUMMARY

An agar gel electrophoresis pointed out the isoperoxidases of the proteic extracts of the various parts of the pea seeds in the first seven days of germination. Differences between the number of the isoenzymes existing in the parts of the embryonal axis and those of the cotyledons still the first 24 hours of germination were found. Almost all the isoenzymes appearing into the embryo after 3 days of germination were found as well after 5 and 7 days of germination. Organospecific differences concerning the number, the electrophoretic mobility and the staining intensity of some fractions were found.

ST. CERC. BIOCHIM., II. 3, 255–259 (1968)

MODIFICAREA STRUCTURII CATALAZEI SANGUINE PRIN INHIBIȚIA EI CU CIANURĂ DE SODIU

A. CSONTOS

Rezumat. — Studiul efectuat cu privire la acțiunea cianurii de sodiu asupra activității catalazei sanguine evidențiază că pe lîngă fenomenele de ordin chimic, inhibiția funcțiilor enzimatice este corelată cu starea enzimei integrate în structura materiei vii. Modificările structurale cauzate de agenți externi sau interni favorizează inhibiția produsă de cianură. Pe de altă parte, această inhibiție evidențiază că în anemia feriprivă și în boala canceroasă se produc modificări structurale ale catalazei sanguine.

Rolul biologic al heminelor celulare de a transporta electroni se desfășoară prin atomii de fier cuprinși în structura lor. Cianurile formînd complecși cu fierul, inhibă activitatea acestor enzime [10].

Presupunem că în procesele terminale oxido-reductive catalaza acționează în captarea și transferul electronilor în mod asemănător cu sistemul citocromic. Ionii de cianură blochează reoxidarea citocromului, ca și activarea oxigenului de către citocromoxidază în vederea fixării ionilor de hidrogen [4], [11]. În literatura de specialitate nu dispunem decît de puține date despre mecanismul acțiunii cianurii de sodiu asupra activității catalazei sanguine. Pe baza concepției noi [7] despre raportul dintre medicamente și enzime, în lucrarea de față am studiat:

1. Modificările ce intervin în activitatea catalazei sanguine în urma administrării de cianură de sodiu, în diferite cantități, la sistemul de reacție enzimă-substrat (*in vitro*).
2. Acțiunea cianurii asupra activității catalazei sanguine în cazul modificării timpului de incubație a sistemului enzimă-cianură.
3. Măsura în care modificările structurale ale enzimei se pot evidenția prin inhibiția datorită cianurii.
4. Felul în care raportul existent între inactivarea produsă de cianură în anemia feriprivă și boala canceroasă contribuie la cunoașterea modificărilor structurale enzimatice în cursul acestor îmbolnăviri.

METODA DE LUCRU

Determinările au fost efectuate la temperatura de 37°C, într-un mediu cu pH 7,2–7,4, cu un timp de reacție de 30 min. La 1 µl de sînge am adăugat cantitatea respectivă (0,01–5 mg) de cianură de sodiu Merk, precum și după nevoie histamina 0,02 mg, iar apa oxi-

genată (2 ml din sol 0,68%) a fost pipetată în eprubete imediat sau după o incubaţie prealabilă de 10 min cu cianură, respectiv histamină. Apa oxigenată descompusă de catalază a fost determinată printr-o variantă proprie /2/ a metodei Bach-Zubkova [12].

În condiţiile noastre experimentale, 1 μl de sînge recoltat de la persoane tinere şi sănătoase descompune între 7 şi 8,5 mg apa oxigenată.

Rezultatele obţinute s-au prelucrat statistic cu ajutorul testului „t".

REZULTATELE OBŢINUTE

Recoltînd sînge de la 130 de persoane tinere şi sănătoase, am urmărit acţiunea diferitelor cantităţi de cianură asupra activităţii catalazei sanguine (tabela 1).

Tabela 1

Variaţia activităţii catalazei sanguine în raport cu cantitatea de cianură de sodiu adăugată. (mg H^2 O_2 descompusă în timp de 30 min. la 37°C)

Cantitatea de cianură adăugată la 1 μl sînge	Cazuri examinate	Activitatea catalazei sanguine				
		înainte de cianurare		după cianurare		
		M*	S±**	M	S±	P***
0,01 mg	25	8,25	0,26	7,65	0,28	0,02—0,05
0,05	20	8,52	0,25	7,42	0,20	0,001
0,10	20	7,95	0,25	6,55	0,15	0,001
1,0	25	8,15	0,25	3,05	0,10	0,001
3	20	8,0	0,35	0,50	0,05	0,001
5	20	9,15	0,20	0	0	0

Explicaţia prescurtărilor din text:

M * = media valorilor calculate în mg
S ** = deviaţia standard
P *** = probabilitate de transgresiune

La un număr de 60 de cazuri, prin analize efectuate concomitent am determinat cantitatea de apă oxigenată descompusă de catalază în cazul cînd substratul a fost adăugat imediat sau după o incubaţie prealabilă de 10 min cu cianură (tabela 2).

Tabela 2

Activitatea catalazei sanguine, determinată imediat sau după o incubaţie prealabilă cu cianură.

Cantitatea de cianură de Na mg	Cazuri examinate	Valoarea iniţială		Activitatea catalazei					
				imediat după cianurare			după 10 min de incubaţie cu cianură		
		M	S±	M	S±	P	M	S±	P
0,01	40	8,60	0,2	8,30	0,2	0,1—0,2	7,95	0,25	0,01—0,02
0,10	10	8,45	0,18	7,05	0,2	0,001	7,15	0,22	0,001
5,0	10	8,20	0,17	0	0	0	0	0	0—

Semnificaţia prescurtărilor: ca în tabela 1.

La un număr de 50 de analize am adăugat la diluția de sînge histamină sau cianură de sodiu, precum și ambele substanțe în ordine variată, fixînd timpul de incubație la 10 min (tabela 3).

Tabela 3

Cantitatea de apă oxigenată descompusă de catalază în urma acțiunii histaminei și a cianurii, după un timp de incubație de 10 min.

Denumirea componentelor de reacții	Reacția de control	Cantitatea substanțelor pipetate în reacție și activitatea catalazei sanguine în eprubeta nr:			
		1	2	3	4
Diluția de sînge 1	1	1	1	1	1
Histamina mg	—	0,02	—	0,02 /I/	0,02 /II/
Cianură de Na mg	—	—	0,01	0,01 /II/	0,01 /I/
Apa oxigenată mg	13,6	13,6	13,6	13,6	13,6
Apa oxigenată descompusă de catalază mg	7,80 (±0,20)	7,30 (±0,15)	7,10 (±0,2)	6,60 (±0,3)	7,05 (±0,25)

Explicația prescurtărilor din text:

(I) = prima substanță pipetată în eprubete

(II) = a doua substanță pipetată în eprubete

La 80 de persoane cu anemie feriprivă și 70 de bolnavi canceroși diluția de sînge (1 ml = 1 μl) a fost tratată cu 0,01 mg cianură de sodiu, determinîndu-se modificările activității catalazei sanguine (tabela 4).

Tabela 4

Inactivarea catalazei de către cianură de Na în anemia feriprivă și în boala canceroasă

Diagnostic clinic	Cazuri examinate	Activitatea catalazei sanguine				
		valoarea inițială		după tratare cu cianură de Na (0,01 mg)		
		M	S±	M	S ±	P
Anemia feriprivă	80	5,85	0,12	5,50	0,10	0,001
Boala canceroasă	70	10,15	0,25	8,90	0,24	0,01 0,001

Semnificația prescurtărilor: ca în tabela 1.

DISCUȚII

Este cunoscut faptul că activitatea unei enzime care a devenit componenta structurală a materiei vii diferă de aceea pe care enzima respectivă o exercită atunci cînd se află în soluția pe care o cercetăm. Deci, rezultatele cercetărilor *in vitro* nu pot fi considerate valabile pentru organismul viu decît atunci cînd substanța studiată acționează asupra funcției enzimei atît *in vitro* cît și *in vivo*, dar numai cu condiția să se țină cont și de diferența împrejurărilor în care reacția se desfășoară [7].

În lucrările noastre precedente [2], [3] am demonstrat că histamina inhibă *în vitro* şi *în vivo*, în mod semnificativ, activitatea catalazei sanguine. Am presupus că această inhibiţie se datoreşte parţial acţiunii directe a histaminei faţă de enzimă. Putem adăuga acum că dacă cianura de sodiu este pipetată în sistemul de reacţie după o incubaţie prealabilă a acestuia cu histamină, atunci inhibiţia activităţii catalazei sanguine este şi mai accentuată. Probabil că histamina, modificînd structura catalazei, favorizează acţiunea cianurii de sodiu.

În posesia acestor date putem deci să deducem că acţiunea cianurii de sodiu, care şi ea produce diferite modificări la nivelul materiei vii, depinde şi de starea (integritatea structurală) în care se află catalaza sanguină, ceea ce, de altfel, a fost confirmat şi prin rezultatele experienţelor efectuate cu sînge recoltat de la persoane cu anemie feriprivă, precum şi de la canceroşi. Aceste date ne arată că răspunsul (inhibiţia) atît din punct de vedere cantitativ cît şi calitativ este în funcţie de starea patologică în care se află organismul cercetat. Am constatat de altfel [3], [5] că în anemia feriprivă, în tuberculoză şi în diferite stări caşectice activitatea catalazei sanguine este scăzută. În boala canceroasă, începînd chiar cu faza iniţială a bolii, activitatea enzimei creşte în mod foarte semnificativ [5]. Această hipo respectiv hiperactivitate enzimatică poate deci să se datorească şi modificărilor structurale intervenite în cursul îmbolnăvirilor.

Este de semnalat faptul că în boala canceroasă cianura de sodiu, în cantitate de 0.01 mg/l de sînge, inhibă în mod mai accentuat activitatea catalazei decît în anemia feriprivă. În ceea ce priveşte felul inhibiţiei produse de 0,01 mg cianură de sodiu, se constată că avem de-a face cu o inhibiţie necompetitivă, întrucît la această doză cianura nu reacţionează cu apa oxigenată.

În cantităţi de peste 5 mg/2 ml H_2O_2, cianura de sodiu are o acţiune catalitică propriu-zisă asupra apei oxigenate.

După cum am demonstrat, se observă că acţiunea cianurii de sodiu este corelată şi cu timpul de incubaţie enzimă-substrat. Pentru 0,01 mg cianură la 1 l de sînge, inactivarea optimă se obţine la o incubaţie de 10 min.

Acţiunea intensă a cianurilor asupra heminelor celulare nu ne permite să studiem în organismul viu legităţile fenomenelor cibernetice şi biologice care se produc la nivelul materiei vii. Lucrarea de faţă însă, pe baza noilor principii privind comportarea structurii materiei vii faţă de acţiunea diferiţilor agenţi, ne-a permis să examinăm unele relaţii existente între acţiunea cianurii de sodiu şi activitatea catalazei sanguine.

CONCLUZII

1. — Cianura de sodiu (*in vitro*), agent toxic extern, influenţează activitatea catalazei sanguine. Inhibiţia provocată de cianură este în raport cu cantitatea adăugată în sistemul de reacţie /enzimă-substrat/. 0,01 mg cianură de sodiu la 1 l de sînge inhibă parţial, iar 5 mg cianură suspendă complet activitatea aceleiaşi cantităţi de sînge.

2. — Inactivarea efectuată de cianură în doze mici este corelată cu timpul de incubaţie.

3. — Întrucît histamina și unele îmbolnăviri favorizează acțiunea inhibitoare a ionilor de cianură, se poate deduce că ele se reflectă în structura materiei vii.

Prezentată la redacție la 25 decembrie 1967

Laboratorul Policlinicii nr. 2, Tîrgu Mureș

BIBLIOGRAFIE

1. Beral, E. Zapan M., *Chimia organică*, Ed. tehnică, București, 1963.
2. Csontos A., Birău H., Med. int. **17**, *3*, p. 331 (1965).
3. Csontos A., St. cerc. biochim. **7**, 307 (1965).
4. Csontos A., Med. int. **16**, 1313 (1964).
5. Csontos A., Oncol. radiol. *3*, 203 (1965).
6. Ianu A., *Chimie anorganică*, Ed. didactică. București, 1963.
7. Macovschi E., St. cerc. biochim. **9**, 3 (1966).
8. Nenițescu C. D., *Chimie generală*, Ed. tehnică, București, 1963.
9. Secăreanu Șt., *Chimie organică medicală*, Ed. didactică, București, 1964.
10. Soru E., *Biochimie medicală*, Ed. medicală, București, 1959.
11. Straub F. B., *Biokémia*, Budapesta, 1958.
12. Szolnceev E., *Biokémiai gyakorlatok*, 1956.

THE MODIFICATION OF BLOOD CATALASE STRUCTURE THROUGH ITS INHIBITION WITH SODIUM CYANIDE

SUMMARY

The investigation concerning the sodium cyanide action on the blood catalase activity emphasizes that besides the chemical phenomena, the inhibition of the enzymatic functions is correlated with the state of the enzyme integrated in the structure of the living matter. The structural modifications caused by the external or internal factors facilitate the inhibition produced by the cyanide. On the other hand, this inhibition emphasizes that in anaemia by iron defficiency and in cancer, structural modifications of the blood catalase take place.

ST. CERC. BIOCHIM. II, 3, 261–268 (1968)

CARACTERIZARE SPECTROFOTOMETRICĂ A ADN DUPĂ IRADIERE *IN VIVO*. IV. ACȚIUNEA DEZOXIRIBONUCLEAZEI ASUPRA ADN EXTRAS DE LA ANIMALE NORMALE SAU IRADIATE

MARIA FURNICĂ

Rezumat. — ADN extras din ficatul șobolanilor iradiați cu 900 r este mai rezistent la acțiunea denaturantă a dezoxiribonucleazei pancreatice (efect hipercromic 15%), în comparație cu ADN extras din ficatul normal (efect hipercromic 29%). Administrarea de AET nu protejează ADN față de modificările care îl fac rezistent la acțiunea DN-azei. Efectul iradierii se manifestă numai în cazul utilizării dozelor letale și numai după 10 zile de la iradiere. Administrarea de cocarboxilază la șobolani iradiați cu 900 r are ca urmare apariția unui ADN rezistent la acțiunea DN-azei, chiar la 3 zile de la iradiere.

Nucleazele cu specificitate de acțiune pot servi ca reactiv pentru determinarea structurii primare și secundare a acizilor nucleici [1], [2], [3], [4]. În afară de acțiunea de degradare, care permite punerea în evidență a unor secvențe nucleotidice, DN-aza poate acționa și ca agent denaturant, permițînd lămurirea unor aspecte ale structurii secundare a ADN [5]. Ca și alți agenți denaturanți fizici (căldură, iradiere *in vitro*) sau chimici (acizi, alcali, HCHO etc.), DN-aza poate desface legăturile de hidrogen stabilite între cele două catene ale helixului de ADN, eliberînd grupările cromofore ale purinelor și pirimidinelor. Intensitatea de acțiune a DN-azei asupra unui preparat de ADN se măsoară prin intensificarea absorbției la 260 mμ a preparatului de ADN, în comparație cu proba fără DN-ază.

În lucrări anterioare privind caracterizarea spectrofotometrică a ADN după iradiere *in vivo*, am arătat că, la 10 zile de la iradiere, ADN extras prezintă o serie de modificări fizico-chimice care îl deosebesc de ADN normal. Acest ADN este mai rezistent la acțiunea căldurii și a alcaliilor [6], [7]; rezistența este reală și nu reprezintă rezultatul unor rupturi parțiale, prealabile, ale catenelor, deoarece după o iradiere *in vitro* acest ADN își recapătă labilitatea normală față de acțiunea ulterioară a agenților denaturanți [8]; structura bicatenară a acestui ADN a fost demonstrată prin determinarea profilului termic (9) și prin studiul absorbției în U.V. la pH 2 [6], [8], [10].

Am considerat că urmărirea comportării față de acțiunea DN-azei a ADN extras de la animale iradiate va aduce date în plus în vederea caracterizării acestui ADN, a lămuririi acțiunii dozelor letale de radiații

și a influenței substanțelor care modifică radiosensibilitatea (radioprotectori, radiosensibilizatori).

Comportarea diferitelor preparate de ADN (normale sau iradiate) față de acțiunea DN-azei am urmărit-o pe două căi :

— prin cinetica de reacție a DN-azei cu diferite preparate de ADN ;

— prin măsura sensibilității diferitelor preparate de ADN, incubate în anumite condiții de temperatură și pH, față de DN-aza pancreatică.

MATERIAL ȘI METODE

Experiențele au fost efectuate pe 420 de șobolani Wistar de 100—200 g. Iradierea animalelor a fost făcută la un aparat de teleröntgenterapie, cu următoarele constante : 180 kW, 15 mA, 0,5 mm Cu, 1,20 m distanță focală, 8,7 r/minut. Animalele au fost iradiate cu 900 r și sacrificate după 3 zile sau după 10 zile de la iradiere. O parte din animalele sacrificate după 3 zile de la iradiere au primit înainte de iradiere 10 mg/kg corp cocarboxilază sau 60 mg/kg corp DL-α-alanină. O altă parte din animalele sacrificate după 10 zile de la iradiere au primit 250 mg/kg corp AET. Br. H. Br (aminoetilen izotiuroniu). O altă serie de animale au fost iradiate cu 300 r și sacrificate după 10 zile de la iradiere. Fiecare din loturile descrise mai sus a fost format din 60—80 de șobolani.

De la fiecare din aceste loturi s-a extras ADN din ficat prin metoda Zamenhof [5], cu purificările descrise în lucrări anterioare [6], [8], [9].

Determinarea cineticii de reacție a DN-azei [5]. Soluția de rezervă de ADN se diluează cu NaCl 0,01 M pînă la concentrația finală de 10 γ/ml. Se determină absorbția în U.V. la 260 mμ și 320 mμ, folosind 3 ml soluție diluată de ADN. Se adaugă apoi direct în cuva de cuarț a spectrofotometrului 0,1 ml soluție $MgCl_2$ 0,01 M și 0,06 ml din soluția de DN-ază pancreatică (Karl Roth, salzfrei) conținînd 100 γ DN-ază/ml. Se determină din nou absorbția la 260 mμ și 320 mμ, din 5 în 5 minute, timp de 15 minute, la temperatura camerei. Controlul acțiunii DN-azei s-a făcut urmărind în paralel acțiunea ei asupra preparatelor de ADN native sau denaturate termic.

Denaturarea termică : soluția de ADN se încălzește 10 min la 90°C, în eprubetă cu dop, și se răcește rapid pe gheață.

Calculul absorbției la 260 mμ se face după scăderea citirii de la 320 mμ și după corecția de volum datorită reactivilor adăugați. Acțiunea DN-azei se măsoară prin intensitatea efectului hipercromic în proba cu DN-ază, în comparație cu proba fără DN-ază.

Incubarea diferitelor preparate de ADN cu DN-ază pancreatică (11) : 100 γ ADN, dizolvate în 1 ml NaCl 0,01 M, se incubează 30 min la 37°C cu 4 γ DN-ază pancreatică activă sau inactivată (prin încălzire de 10 min la 100°C), în tampon fosfat M/15 de pH 7,4 și în prezența a 0,1 ml $MgCl_2$ 0,01 M. Din amestecul de reacție se iau 0,6 ml, care se aduc la un volum final de 3 ml cu NaCl 0,01 M, și se determină curba de absorbție în U.V. între 230 și 320 mμ. Din curbele de absorbție s-au calculat coeficienții spectrali E_{260}/E_{220}, E_{260}/E_{280} și E_{260}/E_{290}.

REZULTATE

1. Ca studiu preliminar s-a urmărit capacitatea dezoxiribonucleazei pancreatice de a denatura un preparat normal nativ de ADN prin măsura efectului hipercromic produs la 260 mμ. DN-aza adăugată la soluția de ADN nativ în proporție de 1 : 6 în prezența de $MgCl_2$ produce un efect

hipercromic de 29% asupra ADN normal. Adaosul de DN-ază la un ADN normal, dar denaturat termic, nu modifică absorbția la 260 mμ (tabela 1).

Tabela 1

Acțiunea dezoxiribonucleazei asupra ADN nativ sau denaturat termic extras de la animale normale

Preparat	$E_{260\ m\mu}$	Efect %
Nativ	0,160	29
Nativ + DN-ază	0,206	—
Denaturat termic	0,220	—
Denaturat termic + DN-ază	0,219	0

2. *Cinetica de reacție a DN-azei cu ADN normal sau iradiat.* Efectul hipercromic după adiția de DN-ază la diferite preparate a fost urmărit *în timp*, prin mărimea efectului hipercromic produs (fig. 1). Din determinarea vitezei de reacție a DN-azei se constată intensități diferite asupra diferitelor preparate de ADN. Se observă că avem de fapt două serii de preparate de ADN : unele extrase de la șobolani normali sau iradiați cu doze neletale, iar altele extrase de la animale iradiate cu doze letale, la care s-a asociat administrarea de substanță radioprotectoare (AET). În prima categorie de preparate, viteza de reacție a DN-azei, testată prin creșterea absorbției la 260 mμ în funcție de timp, este mai mare, pe cînd la preparatele de ADN din a doua categorie activitatea DN-azei este mai lentă. Se constată

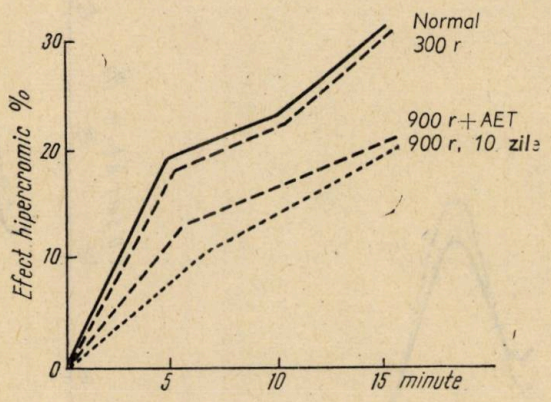


Fig. 1. — Cinetica de reacție a DN-azei pancreatice cu diferite preparate de ADN.

că efectul DN-azei este redus numai asupra ADN extras din ficatul șobolanilor iradiați cu doze letale (900 r), chiar dacă s-a administrat animalului și AET. ADN extras după iradiere cu 300 r se comportă foarte asemănător cu ADN normal.

3. *Incubarea diferitelor preparate de ADN cu DN-ază* a constituit al doilea model experimental pentru studiul iradierii asupra

ADN. În această reacție, raportul între ADN și DN-ază (activă sau inactivă termic) este de 25 : 1. Figurile 2, 3, 4 și 5 reprezintă curbele de

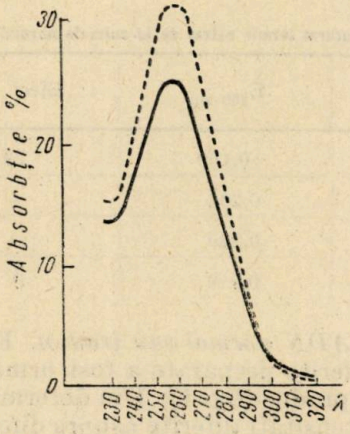


Fig. 2. — Curba de absorbție a ADN extras de la șobolani normali.

——— cu DN-ază inactivată termic;
– – – cu DN-ază activă.

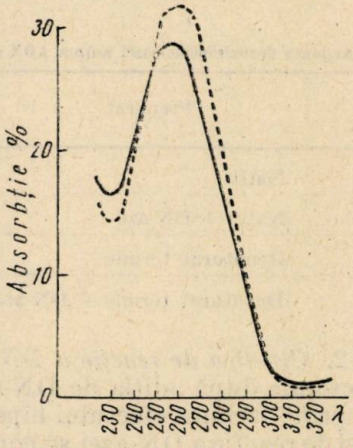


Fig. 3. — Curba de absorbție a ADN extras de la șobolani iradiați cu 900 r și sacrificați după 10 zile de la iradiere.

——— cu DN-ază inactivată termic;
– – – cu DN-ază activă.

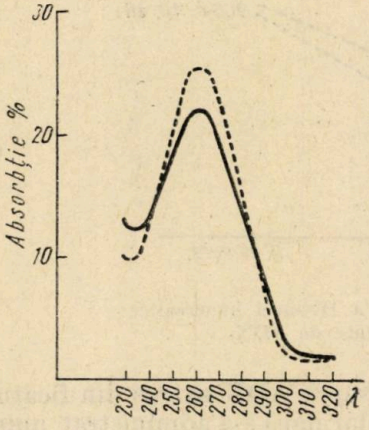


Fig. 4. — Curba de absorbție a ADN extras de la șobolani iradiați cu 900 r + AET (10 zile).

——— cu DN-ază inactivată termic;
– – – cu DN-ază activă.

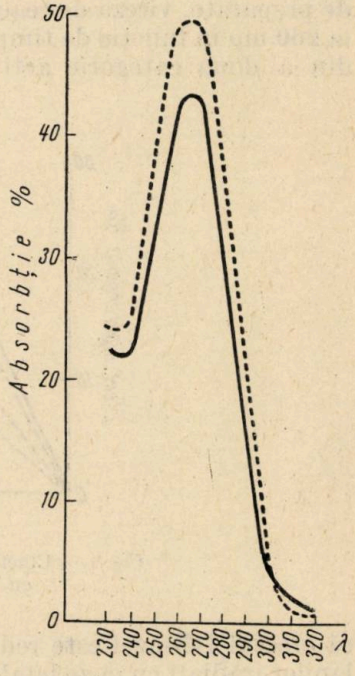


Fig. 5. — Curba de absorbție a ADN extras de la șobolani iradiați cu 900 r + cocarboxilază (3 zile).

——— cu DN-ază inactivată termic;
– – – cu DN-ază activă.

absorbție ale ADN normal sau iradiat cu 900 r (10 zile), sau iradiat + AET (10 zile), sau iradiat + cocarboxilază (3 zile), înainte și după tratare cu DN-ază pancreatică. În toate cazurile se constată o creștere a absorbției în U.V., dar în grade diferite, așa cum am constatat și la urmărirea vitezei de reacție a DN-azei.

Expresia cantitativă a curbelor de absorbție a diferiților acizi dezoxiribonucleici sub acțiunea DN-azei este prezentată în tabela 2.

Tabela 2

Acțiunea dezoxiribonucleazei pancreatice asupra ADN extras de la șobolani normali sau iradiați în diferite condiții experimentale

Preparatul	λ max.	λ min.	$\frac{E_{260}}{E_{230}}$	$\frac{E_{260}}{E_{280}}$	$\frac{E_{260}}{E_{290}}$	Efect hipercromic
ADN normal						
+ DN-ază inactivă	260	230	1,87	1,87	3,87	
+ DN-ază activă	260	230	2,26	1,87	4,46	29% (28–31)
ADN 900 r, 10 zile						
+ DN-ază inactivă	260	233	2,20	1,79	3,63	
+ DN-ază activă	261	234	2,38	1,61	3,67	15% (13–17)
ADN 900 r + AET, 10 zile						
+ DN-ază inactivă	260	231	1,80	1,63	3,37	
+ DN-ază activă	260	238	2,71	1,76	3,81	15% (14–20)
ADN 900 r, 3 zile						
+ DN-ază inactivă	260	232	1,70	1,55	3,18	
+ DN-ază activă	261	231	1,59	1,44	3,56	28% (27–30)
ADN 900 r + cocarboxilază, 3 zile						
+ DN-ază inactivă	260	235	2,26	1,64	3,43	
+ DN-ază activă	260	235	2,50	1,54	3,65	19% (14–20)
ADN 900 r + alanină, 3 zile						
+ DN-ază inactivă	261	232	2,19	1,42	2,91	
+ DN-ază activă	262	232	1,87	1,57	3,87	30% (27–31)
ADN 300 r, 10 zile						
+ DN-ază inactivă	260	230	2,32	1,78	3,08	
+ DN-ază activă	260	230	2,07	1,73	3,15	29% (28–30)

Se constată că și în aceste condiții, în ADN normal DN-aza produce un efect hipercromic de 29%; în ADN iradiat cu doze letale, efectul este mult mai redus (15%). Considerînd efectul hipercromic produs de DN-ază asupra ADN normal ca 100%, în cazul ADN iradiat cu 900 r (10 zile) efectul DN-azei este de numai 53%. Un efect analog se observă și la ADN extras de la animale iradiate sub protecție de AET. După 3 zile de la radiere, ADN iradiat cu 900 r nu-și modifică susceptibilitatea sub acțiunea DN-azei, în timp ce administrarea de cocarboxilază mărește rezistența acestui ADN la acțiunea DN-azei; efectul hipercromic reprezintă în acest caz doar 67% din cel al ADN iradiat fără cocarboxilază și extras la 3 zile.

Tot din tabela 2 se constată că sub acțiunea DN-azei nu au loc deplasări ale curbei de absorbție, toate preparatele prezentînd absorbția maximă la 260 mμ. Absorbția minimă s-a menținut la 230 mμ pentru ADN normal sau iradiat cu 300 r și a variat între 233 și 238 mμ pentru ADN iradiat cu doze letale.

Studiul coeficienților spectrali ne arată următoarele date mai concludente :

— Raportul E_{260}/E_{280} nu se modifică sub acțiunea DN-azei în preparatul normal sau iradiat cu 300 r. La ADN 900 r (10 zile) și ADN 900 r + cocarboxilază, valorile sînt ceva mai scăzute, probabil în urma faptului că absorbția la 260 mμ crește mai puțin.

— Raportul E_{260}/E_{290} crește mult după adiția de DN-ază la ADN normal, ca urmare a faptului că absorbția se intensifică mult la 260 mμ și prea puțin la 290 mμ. În ADN 900 r (10 zile) și ADN 900 r + cocarboxilază, absorbția la 260 mμ crește numai cu 50% față de normal (considerat 100%), fapt care explică de ce și creșterile raportului E_{260}/E_{290} sub acțiunea DN-azei sînt mici.

DISCUȚII

Slabul efect hipercromic rezultat din acțiunea DN-azei asupra ADN iradiat *in vivo* poate avea mai multe explicații.

Cea mai simplă ar fi aceea a existenței unor rupturi în una din catenele de ADN, în urma acțiunii nucleazelor tisulare activate de iradiere [2]. Astfel de rupturi se produc în ADN și după tratamentul cu anumiți agenți alchilanți [11].

O altă cauză a efectului hipercromic redus ar fi rezistența reală a macromoleculei de ADN la acțiunea DN-azei, așa cum am observat și la acțiunea căldurii [6], [9]. Preparate de ADN rezistente la acțiunea DN-azei se cunosc :

— ADN extras de la bacteriofagii din seria T, la care citozina este înlocuită cu hidroximetilcitozină [13], [14];

— ADN iradiat în soluție apoasă cu radiații U.V., în urma formării legăturilor încrucișate și în special a dimerilor timinei [15].

În cazul nostru, rezistența la acțiunea DN-azei s-ar putea datori apariției unor ramificări în moleculă, în modul următor : într-una din catene se produc imediat ruperi în urma acțiunii fizico-chimice directe a radiațiilor ; două monocatene, aparținînd la două macromolecule diferite, se pot uni formînd o structură ramificată, mai rezistentă la acțiunea DN-azei. Nu putem admite prima ipoteză, aceea a apariției unor rupturi în catenă sub acțiunea nucleazelor, căci după iradiere *in vitro* cu 40 Kr acest ADN extras de la animale iradiate devine susceptibil la acțiunea DN-azei [8]. S-ar părea că este vorba mai mult de o împiedicare sterică, iradierea *in vitro* — prin depolimerizarea pe care o produce — putînd să favorizeze acțiunea denaturantă a DN-azei.

Analiza efectelor DN-azei pancreatice asupra diferitelor preparate de ADN arată o mare asemănare între ADN extras după 10 zile de la iradiere de la animale iradiate cu 900 r și cel extras după 3 zile de la

animale iradiate în prezență de cocarboxilază. Asemănarea acestor acizi dezoxiribonucleici se manifestă atît prin relativa lor rezistență la acțiunea DN-azei, cît și prin coeficienții spectrali care caracterizează cantitativ curbele lor de absorbție în U.V., după acțiunea DN-azei. Aceste rezultate arată că administrarea de substanțe radiosensibilizatoare produce un efect de accelerare în timp a postefectelor iradierii, sugerînd astfel un mecanism de acțiune al acestor substanțe.

Rezultatul principal al experiențelor noastre constă în aceea că utilizarea DN-azei permite punerea în evidență a unor modificări fizico-chimice suferite de macromolecula de ADN după iradiere *in vivo*.

CONCLUZII

1. ADN extras de la șobolani iradiați cu 900 r și sacrificați după 10 zile de la iradiere prezintă rezistență față de acțiunea denaturantă a dezoxiribonucleazei pancreatice.

2. ADN extras de la șobolani iradiați cu 300 r (doză neletală) se comportă ca un ADN normal față de acțiunea dezoxiribonucleazei.

3. ADN extras la 3 zile după iradierea cu 900 r nu se deosebește de ADN normal în privința comportării față de acțiunea dezoxiribonucleazei. Administrarea de cocarboxilază animalului de experiență accelerează *în timp* producerea modificărilor ADN-ului, care devine rezistent la acțiunea dezoxiribonucleazei, chiar după 3 zile de la iradiere.

4. Administrarea de AET animalului iradiat cu 900 r nu protejează ADN față de modificările fizico-chimice produse de iradiere și care îl fac rezistent la acțiunea dezoxiribonucleazei.

Prezentată la redacție la 13 martie 1968 *Institutul oncologic București*

BIBLIOGRAFIE

1. Lehman I. R., *The deoxiribonucleases of E. coli. I. Purification and properties of a phosphodiesterase*, J. Biol. Chem. **235**, 1479 (1960).
2. Gillespie D., Spiegelman S., *A qualitative assay for DNA—RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane*, J. mol. Biol. **12**, 829 (1965).
3. Lehman I. R., Roussos G. G., Pratt E. A., *The deoxyribonucleases of E. coli*, J. Biol. Chem. **237**, 819 (1962).
4. Kunitz A., J. gen. Physiol., **33**, 349 (1950).
5. Hotchkiss R. D., *Methods for characterization of nucleic acids*, în S. P. Colowick, N. O. Kaplan, *Methods in enzymology*, vol. III, p. 708, Academic Inc. Publishers, New York, 1957.
6. Furnică Maria, *Caracterizare spectrofotometrică a ADN după iradiere in vivo. I. Comportarea față de acțiunea unor agenți denaturanți (căldura, acizi, alcalii)*, St. cerc. biochim. **10**, 229 (1967).
7. Furnică Maria, *Modificări fizico-chimice produse de radiațiile X asupra macromoleculei de ADN*, Fiziol. norm. patol. **XIII**, 345 (1967).
8. Furnică Maria, *DNA spectrophotometric characterization after irradiation. III. Influence of irradiation in vitro on the behaviour against denaturating agents of DNA extracted from normal or irradiated animals*, Rev. roum. Biochim. (sub tipar) (1968).
9. Furnică Maria, *DNA spectrophotometric characterization after irradiation in vivo. II. Thermic transition and influence exerted by radioprotective (AET) and radiosensiting substances (cocarboxylase)*, Rev. roum. Biochim. (sub tipar) (1968).

10. FURNICĂ MARIA, BOTEZ GEORGETA, SPIRIDON MIHAI, *Influența iradierii in vitro asupra denaturabilității ADN extras de la animale normale sau iradiate*, Comunicată la Simpozionul de *Acizi nucleici biologic activi*, 9—11 oct. 1967, București.
11. STRAUSS B. S., WAHL R., *The presence of breaks in DNA of B. subtilis, treated in vivo with alkylating agent methylmethanesulfonate*, Biochim. Biophys. Acta **80**, 116 (1964).
12. GOUTIER R., GOUTIER PIROTTE M., CICCARONE P., *Effects of total body irradiation on rat spleen and liver desoxyribonuclease*, în A. BUZZATI-TRAVERSO, *Immediate and low level effects of ionizing radiations*, Taylor-Francis LTD, Londra, 1960, p. 93.
13. COHEN S. SEYMOUR, *The biosynthesis of nucleic acids in some microbial systems*, în *A Symposium on the chemical basis of heredity*, Sub red. W. D. MC. ELROY, B. GLASS, The John Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 650.
14. RICHARDSON CH. C., *Influence of glucosylation of DNA on hydrolysis by DNA-ases of E. coli*, J. biol. Chem. **241**, 2084 (1966).
15. SETLOW R. B., CARRIER W. L., BOLLUM F. J., *Nuclease-resistant sequences in U.V. irradiated DNA*, Biochim. Biophys. Acta **91**, 446 (1964).

DNA SPECTROPHOTOMETRIC CHARACTERIZATION AFTER *IN VIVO* IRRADIATION. IV. THE DE OXYRIBONUCLEASE ACTION ON DNA EXTRACTED FROM NORMAL OR IRRADIATED ANIMALS

DNA extracted from 900 r irradiated rats liver is more resistant to the denaturing action of pancreatic deoxyribonuclease (15 per cent hyperchromic effect) as compared to the DNA extracted from normal liver (29 per cent hyperchromic effect). AET administration does not protect the DNA against the modification which makes it resistant to DN-ase action. The irradiation effect appears only when lethal doses are used and only after ten days of irradiation. The cocarboxylase administered to rats irradiated with 900 r determines the appearance of a DNA resistant to the DN-ase action, even 3 days after irradiation.

ST. CERC. BIOCHIM., 11, 3, 269–273 (1968)

CERCETĂRI ASUPRA SAPOGENINELOR STEROIDICE. PREZENȚA CLOROGENINEI ÎN PLANTA *TRIBULUS TERRESTRIS L.*

GHEORGHIU AUREL și IONESCU-MATIU ELENA

Rezumat. — S-au extras, izolat și purificat trei sapogenine care au punctele de topire, $[\alpha]_D$, Rf-urile, analizele elementare cantitative și spectrale în infraroșu asemănătoare diosgeninei, gitogeninei și clorogeninei. De asemenea și derivații lor acetilați au constante fizico-chimice asemănătoare cu cele indicate în literatură pentru aceste sapogenine.

Prezența clorogeninei nu a fost semnalată pînă în prezent în *Tribulus terrestris* L. Datorită faptului că această plantă are un conținut apreciabil în saponine steroidice, se propune ca sapogeninele ei să fie folosite în industria de medicamente ca bază de plecare la prepararea hormonilor de sinteză.

Se știe că sapogeninele diosgenina, hecogenina, sarsapogenina și tipogenina se folosesc cu precădere la prepararea hormonilor de sinteză și că cele mai multe se găsesc în diferite specii de Yucca [7—10].

Planta *Tribulus terrestris* L., din familia *Zigophyllaceae*, conține de asemenea sapogenine steroidice și crește în flora noastră spontană, în cantități apreciabile, pe cîmpuri, ogoare, margini de drum, fapt ce ne-a determinat să o luăm în studiu în scopul cunoașterii și valorificării ei ca materie primă în industria de medicamente.

Cercetările de pînă acum asupra sapogeninelor din planta *Tribulus terrestris* L. au condus la următoarele rezultate:

Kock și Enslin [3] și Brown și Kock [2] indică în această specie prezența diosgeninei, ruscogeninei, gitogeninei și 25 D-spirosta 3,5 dienei. Wall și colab. [14] izolează o saponină pe care o identifică ca tigonină. Tomova și Panova [12] izolează și identifică diosgenina și desoxydiosgenina, iar Kachukhashvili [5] găsește o metodă pentru izolarea și valorificarea diosgeninei din această plantă.

Întrucît în *Tribulus terrestris* L. diosgenina a fost găsită în proporție de circa 40% față de substanțele eluate, și de circa 36% față de amestecul de sapogenine [12], ne-am propus să cercetăm compoziția chimică în sapogenine din această specie, în vederea găsirii și identificării și a altor substanțe de acest fel.

EXTRACȚIA SAPOGENINELOR

Materialul*) a fost colectat din jurul pădurii Pasărea**). Părțile aeriene din plantă, uscate și mărunțite* *) (500 g) au fost degresate cu dicloretan, în aparatul Soxhlet, timp de 24 de ore, și apoi extrase cu metanol 75%, timp de 24 de ore. Soluția hidroalcoolică a fost concentrată la volum mic, prin distilare sub presiune redusă, adusă la pH 4 cu acid clorhidric și extrasă cu n-butanol saturat cu apă. Soluția de n-butanol a fost separată, concentrată prin distilare, iar reziduul a fost hidrolizat la cald cu o soluție de HCl 4 N, timp de 3 ore, prin agitare continuă într-un balon cu refrigerent cu reflux. Hidrolizatul s-a extras de mai multe ori cu benzen (200 ml). Soluțiile benzenice au fost reunite, soluția rezultată a fost concentrată la 100 ml, spălată cu apă, alcalinizată cu o soluție alcoolică saturată cu hidroxid de sodiu, introdusă în balonul cu refrigerent cu reflux și ținută pe baia de apă, la cald, timp de 20 minute. După răcire, stratul benzenic a fost separat și păstrat, iar stratul alcalin a fost îndepărtat, după ce în prealabil a fost extras încă de două ori cu cîte 100 ml benzen. Soluțiile benzenice au fost reunite, iar după spălare cu apă și uscare pe sulfat de sodiu anhidru, benzenul a fost distilat. Reziduul se prezintă sub forma unei pulberi amorfe și slab gălbuie. Randament = 8,20 g, ceea ce corespunde la 1,64 g% din părțile aeriene ale plantei uscate.

IDENTIFICAREA UNOR SAPOGENINE PRIN CROMATOGRAFIA PE HÎRTIE

O soluție de 1% amestec de sapogenine în benzen a fost supusă unui examen cromatografic.

Pentru separarea sapogeninelor s-a folosit tehnica cromatografică ascendentă, pe hîrtie Whatman nr. 1, în aparatul de cromatografie „Chropa".

Pe benzi de hîrtie (49 × 12 cm) s-au micropipetat : proba de analizat (amestec de sapogenine) și soluțiile martor de diosgenină, gitogenină și clorogenină. Ca fază mobilă s-au folosit mai multe sisteme de solvenți, dintre care cel mai bun s-a dovedit a fi sistemul izooctan-cloroform-acid acetic (100 : 4 : 1) și (100 : 40 : 4) [11]. Timpul de expunere a fost de 3 ore, după care cromatograma a fost uscată în etuvă la 85°—95° și pulverizată cu o soluție alcoolică de vanilină 1%. După uscare din nou la 80 — 90°, timp de 5 minute, cromatograma a fost pulverizată cu un amestec de acid sulfuric concentrat și anhidridă acetică (1 : 20), iar după 1 minut a fost uscată la 100—110°, pînă la apariția unor spoturi galbene (sapogenine steroidice).

---

*) Fostul raion Brănești, București

**) Mulțumim și pe această cale dr. Forstner Silvestru pentru procurarea unei părți din material

***) Gradul de mărunțire a corespuns sitei nr. V.

IZOLAREA SAPOGENINELOR PRIN CROMATOGRAFIA PE COLOANĂ

2,5 g din amestecul de sapogenine s-a dizolvat în benzen, la cald, iar soluţia s-a cromatografiat pe o coloană de oxid de aluminiu (100 g) şi s-a eluat cu cîte 15 fracţiuni de cîte 20 ml din următorii solvenţi: eter etilic, amestec de benzen-metanol, cu diferite proporţii de metanol.

Astfel am constatat că în cazul eluării coloanei cromatografice cu 15 fracţiuni de eter etilic am obţinut un reziduu care după trei recristalizări din etanol s-a prezentat ca o substanţă albă, cristalizată acicular, cu p.t. 204°—206°; $[\alpha]_D^{20°} = -122°$ (în $CHCl_3$, c = 1). Randament = 0,55 g, care corespunde cu 22% din totalul de sapogenine sau 0,35% din părţile aeriene.

La examenul cromatografic, spotul obţinut pe hîrtie a avut aceeaşi valoare Rf ca şi spotul diosgeninei pure folosite ca martor şi s-a colorat în roşu violet ca şi diosgenina, prin pulverizarea cromatogramei cu o soluţie de paraformaldehidă (0,03%) şi acid fosforic.

Analiza elementară cantitativă.

Calculat: % C. 78,19; H. 10,21; O. 11,58

Găsit: % C. 78,34; H. 10,13; O. 11,53 (a)

% C. 78,21; H. 10,15; O. 11,64 (b)

Sapogenina izolată de noi are formula chimică brută $C_{27}H_{42}O_3$, identică cu formula chimică brută a diosgeninei.

În infraroşu prezintă un spectru identic cu acela al diosgeninei.

În literatură sînt date pentru diosgenină următoarele constante:

p.t. 205°—208°, $[\alpha]_D = -121°$ (în $CHCl_3$; c = 1) [6];

p.t. 203—205°, $[\alpha]_D = -118° \pm 2°$ (în $CHCl_3$, c = 1) [12];

p.t. 202°—204° $[\alpha]_D = -124°$ (în $CHCl_3$, c = 1) [5]

PREPARAREA PRODUSULUI ACETILAT

100 mg din produsul cristalizat s-a dizolvat în 1 ml piridină, s-a adăugat 1 ml anhidridă acetică şi s-a lăsat 24 de ore la temperatura camerei. Conţinutul acesta a fost adăugat în circa 15 ml apă, la temperatura de + 1°, iar precipitatul format s-a separat prin filtrare şi s-a spălat cu apă rece. După recristalizări repetate din metanol sapogenina respectivă s-a obţinut sub formă de acetat, cu p.t. 197°—199°; $[\alpha]_D = -112°$. În literatură: p.t. 190°—194°; $[\alpha]_D = -107°$ [1], p.t. 202°; $[\alpha]_D = -115$ [16].

Din cele 15 fracţiuni de benzen-metanol (100 : 3) folosite în continuare la eluarea coloanei cromatografice, s-a obţinut un reziduu din care prin repetate recristalizări, din alcool a cristalizat o substanţă cu p.t. 267°—269°; $[\alpha]_D = -68°$ (în $CHCl_3$, c = 1). Randament = 0,18 g care corespunde la 7,2% din totalul de sapogenine şi la 0,11% din părţile aeriene.

La examenul cromatografic, spotul obţinut pe hîrtie a avut aceeaşi valoare Rf ca şi spotul gitogeninei folosite ca martor.

În literatură sînt date pentru gitogenină următoarele constante p.t. 270°—272°, $[\alpha]_D = -75°$ (în $CHCl_3$, c = 1) [6]; p. t. 268°—270°, $[\alpha]_D = -66°$ (în $CHCl_3$, c = 1) [12].

Diacetatul sapogeninei, preparat de noi, are p.t. 235°—237°, $/\alpha/_D^{20°}$ = = — 95°. În literatură: p.t. 233°—237°, $/\alpha/_D$ = — 91,7° [1]; p.t. 237°—242°, $/\alpha/_D$ = — 98° [11].

Analiza elementară cantitativă:

Calculat: % C. 74,93; H. 10,25; O. 14,80

Găsit: % C. 75,10; H. 10,33; O. 14,57 (a)

C. 75,01; H. 10,27; O. 14,72 (b)

Sapogenina izolată de noi are formula chimică brută $C_{27}H_{44}O_4$, identică cu aceea a gitogeninei.

De asemenea această sapogenină prezintă un spectru în infra-roşu identic cu acela al gitogeninei.

În continuare, la eluarea coloanei cromatografice s-au folosit 15 fracţiuni de metanol.

Din reziduul eluantului metanolic s-a izolat o sapogenină care după recristalizări din metanol are p.t. 275°—277°; $/\alpha/_D^{20°}$ = — 44°5 (în $CHCl_3$, c = 1). Randament = 0,28 g, care corespunde la 11,2% din totalul de sapogenine şi 0,17% din părţile aeriene ale plantei.

La examenul cromatografic s-a obţinut un singur spot, care a avut aceeaşi valoare Rf cu a clorogeninei pure folosite ca martor.

În literatură sînt date pentru clorogenină: p.t. 271°—276°; $/\alpha/_D$ = = — 45° (în $CHCl_3$, c = 1) [6].

Acetatul de sapogenină preparat de noi are p.t. 154°—156°. În literatură acetatul de sapogenină are p.t. 152°—155° [13], şi p.t. 155° [15].

Analiza elementară cantitativă.

Calculat: % C. 74,93; H. 10,25; O. 14,80

Găsit: % C. 74,82; H. 10,18; O.15,00 (a)

% C. 74,79; H. 10,22; O. 14,99 (b)

Sapogenina izolată de noi are formula chimică brută $C_{27}H_{44}O_4$, identică cu aceea a clorogeninei.

În infra-roşu această sapogenină prezintă un spectru identic cu acela al clorogeninei folosite ca martor.

Menţionăm că în literatură nu am găsit date cu privire la izolarea şi identificarea acestei sapogenine în planta *Tribulus terrestris* L.

CONCLUZII

S-au extras, izolat şi purificat din *Tribulus terrestris L.* trei sapogenine care au prezentat: punctele de topire $/\alpha/_D$, Rf-urile, analizele elementare cantitative şi spectrale în infra-roşu asemănătoare diosgeninei, gitogeninei şi clorogeninei.

Sapogenina asemănătoare clorogeninei nu a fost semnalată pînă în prezent în *Tribulus terrestris* L.

Părţile aeriene ale acestei plante avînd un conţinut apreciabil în saponine steroidice, sapogeninele lor ar putea fi folosite în industria de medicamente ca bază de plecare la prepararea hormonilor de sinteză.

Prezentată la redacţie la 4 aprilie 1968

Facultatea de farmacie Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Bedour M. S., El. Munajjed D., Fayez M. B. E., Girgis A. N., J. Pharmac. Sci. **10** 1276 (1964).
2. Brown J. M., Kock W. T. de, J. Sth Afr. Chem. Ind. **13**, 180, (1959).
3. Kock W. T. de, Enslin P. R., J. Sth. Afr. Chem. Ind. **11**, 33 (1958).
4. Fieser L. E., Fieser M., *Steroides*, New York-London, **831** (1959).
5. Kachukhashvili T. N., Med. Prom. S.S.S.R., **19**, 46 (1965).
6. Karrer W., Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe, 1958, 864, 865, 869.
7. Kenny H., Serota S., Weaver E., J. Amer. Chem. Soc. **82**, 3680 (1960).
8. Marker r. E., J. Amer. Chem. Soc. **62**, 2543 (1940).
9. Marker R. E., Wagner R. B., Ulschafer P. R., J. Amer. Chem. Soc. **65**, 1199 (1943).
10. Madajewa O. S., Med. Promîşl. **15**, 35 (1961).
11. Sannié C., Lapin H., Bull. Soc. Chim. France **19**, 1880 (1952).
12. Tomova M., Panova D., Farmatia Sofia **15**, 211 (1965).
13. Tschshao-Hua U., Huan Hen-Lu, Huan Min Lu, Ref. J. Chim. **8**, 25290 (1958).
14. Wall M. E., Fenske C. S., Carvin J. W., Willaman Quentin Jones, Schubert B. 6., Untry S. H., J. Amer. Pharm. Ass. **XLVIII**, 695 (1959).
15. Wall M. E., Krider M. M., Rotman E. S., Eddy C. R., J. biol. Chem. **198**, 533 (1952).
16. Wall M. E., Walens H. A., J. Amer. Chem. Soc. **78**, 1747 (1956).

INVESTIGATIONS ON STEROID SAPOGENINS. THE PRESENCE OF CHLOROGENIN IN THE *TRIBULUS TERRESTRIS* L. PLANT

SUMMARY

Three sapogenins have been extracted, isolated and purified, whose melting points, (α_D), Rf, elementary quantitative and infrared spectrum analyses are similar to diosgenin, gitogenin and chlorogenin. Their acetylated derivatives have likewise physicochemical constants, similar to those listed in the literature for these sapogenins.

The presence of clorogenin has not yet been reported in *Tribulus terrestris* L.

Owing to the fact that this plant has a high content of steroid saponins, it is suggested that their sapogenins should be employed in drug industry as a starting point in the preparatin o of synthesis hormones.

ST. CERC. BIOCHIM. II, 3, 275–279 (1968)

FOLOSIREA SOLUȚIILOR DE SĂRURI DE COBALT II CA ETALON LA DOZAREA ACIDULUI 4-HIDROXI-3-METOXI-MANDELIC URINAR

SORIN M. IDU și LUCIA COCIUMIAN

Rezumat. — Dată fiind importanța determinării acidului 4-hidroxi-3-metoxi-mandelic (AVM) urinar, autorii au căutat o substanță colorată care să aibă un maximum de absorbție cît mai apropiat de acela al complexului AVM-diazo-p. nitroanilină, obținut în condițiile metodei Woiwod și Knight.

În mod surprinzător sărurile cobaltoase (clorura și azotatul) experimentate au un maxim de absorbție identic cu cel urmărit la 510 mμ.

Deoarece în condițiile metodei nu se formează complecși cobaltoși care să denatureze curba de absorbție, transformarea extincției în mg AVM/1 000 ml se poate face prin simpla determinare a extincției unei soluții de concentrație cunoscută în sare cobaltoasă.

Se indică modul de calcul.

Adrenalina, izolată de Takamine (1901) și sintetizată de Stolz (1905), cît și noradrenalina, sintetizată de Stolz în 1904, apoi identificată de Von Euler și Holtz abia între 1946—1948 ca fiind identică cu simpatina lui Bacq, sînt catecolamine presoare a căror dozare interesează atît fiziologia experimentală, cît și clinica [5]. Dozarea în sînge a acestor hormoni, utilă în depistarea feocromocitomului, este rezervată laboratoarelor înalt specializate, în timp ce dozarea metaboliților eliminați prin urină, foarte răspîndită și utilă, permite atît depistarea feocromocitomului cît și stabilirea rolului suprarenalei în diverse stressuri, hipertensiune, diabet etc.

Adrenalina marcată se elimină în urină sub formele : adrenalină 3,3%, metadrenalină liberă 7,1%, metadrenalină conjugată 27,3%, acid 4-hidroxi-3-metoxi-mandelic (vanil-mandelic, AVM) 45% [3].

Eliminarea fiziologică a metaboliților în 24 ore : adrenalină și noradrenalină 20—100 μg; metadrenalină și normetadrenalină 100—1100 μg; acid vanil-mandelic 1,45—5,3 mg [3]. Pe lîngă AVM, 1/3 din cataboliți se elimină sub forma de 3-metoxi-4-hidroxi-fenil-glicol (MHPG) [2], [6]. Eliminarea acestor doi cataboliți variază după animal, de exemplu la șobolan, MGPG predomină, în timp ce AVM este în urme.

DOZAREA ACIDULUI VANIL-MANDELIC

S-au propus mai multe tehnici [4], [5] care se bazează, principial, pe două reacții chimice :

1. Cuplarea AVM cu p. nitroanilina diazotată și citire la spectrofotometru [1] (se aplică și în cromatografie și electroforeză de înaltă tensiune).

2. Oxidarea AVM la vanilină, condensare cu indol și dozare spectrofotometrică (Sandler, citat după [5]).

Cele mai multe metode folosesc diazotarea [5], [11], [12] principiu ce stă și la baza metodei Woiwod și Knight [12] folosită de noi. Coloraţia obţinută este raportată la o curbă etalon construită cu AVM, substanţă greu de procurat.

În prezenta notă ne-am propus a găsi o substanţă colorată cu absorbţie cît mai apropiată de a produsului de reacţie dozat în metoda Woiwod și Knight, pentru a putea înlocui AVM pur necesar la construirea curbei etalon.

Curba de absorbţie a produsului colorat AVM-diazo-p. nitroanilină are, după autori, un maximum la 510 mμ. Cercetînd substanţe cu această proprietate, ne-am oprit asupra sărurilor cobaltoase, în speţă clorura și azotatul, care, în mod surprinzător, pe lîngă un maximum de absorbţie identic [8], prezintă și un traseu asemănător al curbei, în funcţie de lungimea de undă (fig. 1), astfel că, alegînd concentraţii potrivite, curbele ar fi aproape superpozabile.

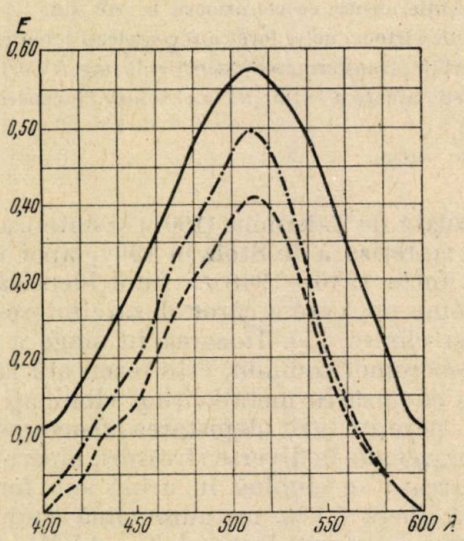


Fig. 1. — Curbe de absorbţie. Spectrofotometru Zeiss VSU 2 P, cuva 1 cm.
_____ Acid vanil mandelic-diazo-p-nitroanilină.
_____ · _____ sol.$Co(NO_3)_2 \cdot 6\ H_2O$ 3 g/100 ml,
– – – – – sol. $CoCl_2.6\ H_2O$ 2 g/100 ml.

După Spacu și Murgulescu [10], spectrul de absorbţie al soluţiilor sărurilor de Co se modifică relativ mult în funcţie de concentraţie. Kiss și Gerendás [7] arată că acidul clorhidric și clorura de calciu fac să crească absorbţia în roșu, iar în UV practic o deplasează spre lungimile de undă mai mari. Din datele autorilor rezultă că în jurul $\lambda = 510$ mμ influenţele sînt minime, iar în condiţiile noastre de lucru, de neperceput.

În scopul urmărit, am realizat o scară de diluţii conţinînd 10, 20, 30, 50, 60 și 80 μg AVM pe probă (dintr-o soluţie de 80 μg/2 ml) în

condiţiile metodei Woiwod şi Knight [12]. În paralel s-au preparat: o soluţie de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 4% şi alta de $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 3%, apoi s-au făcut o serie de diluţii notate în fig. 2, din care rezultă că pentru toate cele trei soluţii cercetate, există o perfectă relaţie excitaţie-concentraţie. După cum rezultă din fig. 1 şi 2, sărurile cobaltoase studiate se pretează

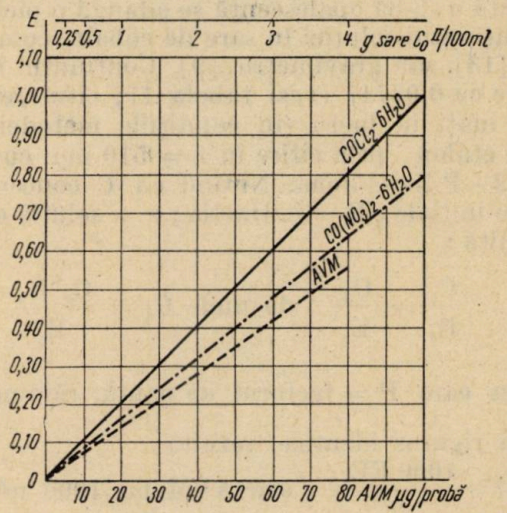


Fig. 2. — Relaţia extincţie-concentraţie. Spectrofotometru Zeiss VSU 2 P, cuva 1 cm, $\lambda = 510$ mμ.

ca succedaneu perfect în scopul urmărit, datorită următoarelor lor calităţi:

1. Absorbţie maximă a clorurii şi azotatului de cobalt, identică cu a AVM în condiţiile metodei Woiwod şi Knight. 2. Curbe de absorbţie asemănătoare, aproape superpozabile. 3. Aplicabilitatea legii Bouguer-Lambert-Beer pe întreg domeniul de concentraţie practic posibil. 4. Soluţii uşor de preparat, cu săruri uşor de găsit.

SOLUŢIA ETALON PROPUSĂ

Deoarece conţinutul în săruri de cobalt a soluţiilor date în fig. 2 a fost precis stabilit prin dozare, cantitatea de sare de cobalt corespunzătoare concentraţiei în AVM (extincţie identică) se calculează uşor sau se deduce grafic (tabela 1).

Tabela 1

Corespondenţa dintre coloraţia dată de AVM şi concentraţiile soluţiilor de săruri de CoII

AVM Woiwod-Knight	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$
80 μg AVM aduşi la 20 ml	2,9975 g/100 ml (= 0,7424 g Co)	3,50 g/100 ml (= 0,7087 g Co)
1 μg AVM în 20 ml	0,03747 g/100 ml (= 0,00928 g Co)	0,04375 g/100 ml (= 0,00859 g Co)

Deoarece curbele sînt drepte de tipul $y = kx$ am renunțat la prepararea unei scări de diluții, folosindu-ne de o soluție etalon de concentrație cunoscută, căreia i-am determinat extincția.

Practic, se cîntăresc 3 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (sau 3,5 g $Co(NO_3)_2\ 6H_2O$), se aduc cu apă distilată într-un balon cotat de 100 ml. După dizolvare, în cazul cînd există o slabă opalescență se adaugă o picătură de HCl 10%. Se determină conținutul soluției în sare de cobalt, complexometric (indicator murexid), [13], sau gravimetric [9]. Conținutul în grame de $CoCl_2\ 6H_2O$ se împarte cu 0,03747 (vezi tabela 1); cîtul reprezintă μg AVM din 2 ml urină luați în lucru (în condițiile metodei). Am determinat extincția soluției etalon prin citire în $\lambda = 510$ mμ, cuva 1 cm, spectrofotometru VSU 2—P Zeiss-Jena. Notînd cu C concentrația în μg AVM în 2 ml de soluție inițială; E = extincția; e = soluție etalon; a = soluție de analizat, rezultă:

$$\frac{C_e}{E_e} = \frac{C_a}{E_a} \quad \text{de unde} \quad C_a = \frac{C_e\ E_a}{E_e}$$

Cum $\frac{C_e}{E_e} = F$, în care F = factorul de pantă, rămîne constant pentru condiții de lucru riguros identice, rezultă:

$$\text{AVM } \mu g/1000 \text{ ml} = \frac{1000\ FE_a}{2} \quad \text{sau AVM mg/1000 ml} = \frac{F}{2} E_a.$$

CONCLUZII

Soluțiile de clorură sau azotat de cobalt descriu o curbă de absorbție foarte asemănătoare cu aceea a produsului AVM-diazo-p. nitro-anilină, obținut în condițiile metodei Woiwod și Knight și au același maxim de absorbție la 510 mμ.

Prin determinări spectrofotometrice cantitative am calculat un factor de transformare al concentrației, din g sare cobaltoasă pe 100 ml în μg AVM în 2 ml soluție de analizat luată în lucru.

Practic, după dozarea precisă a cantității de sare cobaltoasă din soluție etalon și transformarea ei prin calcul în μg AVM, se determină extincția în $\lambda = 510$ mμ. Factorul de pantă se calculează din aceste două date.

Întrucît curbele extincție-concentrație construite cu săruri cobaltoase au un factor de pantă identic cu al acelora obținute cu AVM nu există deosebiri în evaluarea extincțiilor în funcție de etalon.

Prezentată la redacție
la 15 ianuarie 1968

Laboratorul central al clinicilor,
Spitalul „Colțea", București

BIBLIOGRAFIE

1. Armstrong M. D., Shaw K. N. F., Wall P. F., J. biol. Chem. *218*, 293 (1956).
2. Cristol P., Ganon J. P., Ann. Biol. clin. **24**, *1—2*, 155 (1966).
3. Dauchy F., Path. Biol. **14**, *1—2*, 80 (1966).
4. Dauchy F., Giudicelli j. F., Ann. Biol. clin. **23**, *5—6*, 769 (1965).
5. Floch H., Biol. Med. **53**, *4*, 381 (1964).
6. Ganon J. P., Cristol P., Ann. Biol. clin. **24**, *10—12*, 1185 (1966).
7. Kiss A., Gerendas M., Z. phys. Chem. **180**, *2*, 117 (1937).
8. Landolt-Börnstein, *Zahlenwerte und Funktionen aus Physik-Technik-Chemie-Astronomie-Geophysik*, vol. I, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1951, p. 238.
9. Spacu G., Dick J., Z. anal. Chem. **71**, 97 (1927).
10. Spacu G., Murgulescu I. G., Z. phys. Chem. (A) **170**, 62 (1934).
11. Stanley E., Gitlow M. D. et al., Amer. J. Med. **28**, 291 (1960).
12. Woiwod A. J., Knight R., J. clin. Path. **14**, 502 (1961).
13. * * * *Komplexometrische Bestimmungen mit Titriplex*, ed. a 3-a, E. Merck. A. G. Darmstadt.

THE USE OF COBALT^{II} SALTS AS STANDARDS IN THE DETERMINATION OF 4-HYDROXY-3-METHOXYMANDELIC ACID IN URINE

SUMMARY

Knowing the importance of the determination of the 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid in urine, the authors searched for a colored substance whose maximum absorption is similar with that of the vanillylmandelic acid complex obtained by the method of Woiwod and Knight.

Surprisingly, the salts of Co^{++} (chloride and nitrate) experimented have their maximum of absorption identical with that searched for 510 mμ.

Owing to the fact that, in the conditions of this method, complexes with Co^{++} do not result which could modify the absorption curve, the transformation of the optical density in mg VMA 1 000 ml can be carried out by the simple determination of the optical density of a Co^{++} solution of a known concentration.

The mode of calculation is reported.

ST. CERC. BIOCHIM. II, 3 281 – 286 (1968)

FLUOROCROMAREA DISTRUCTIVĂ A ANTICORPILOR

SILVIA MIHĂESCU

Rezumat. — S-au stabilit condiţiile experimentale, de pH, temperatură şi concentraţie a DANS-ului în care a fost diminuată activitatea imunologică a anticorpilor anti-BSA. Se arată repartiţia intramoleculară a DANS-ului în molecula anticorpilor puternic fluorocromaţi şi a unor fragmente provenite din aceştia, constatîndu-se că fragmentul Fd′ fixează o cantitate apreciabilă de DANS. Din analiza cromatografică pe hîrtie a aminoacizilor rezultă că DANS-ul s-ar fixa de resturile de lizină ale fragmentului Fd′.

În lucrări anterioare [1], [2] s-a arătat că, pentru condiţii determinate de pH, temperatură şi concentraţia reactanţilor, în molecula anticorpilor pot fi introduse un număr variabil de molecule de DANS (acidul 1-dimetilaminonaftalen-5-sulfonic). Fixarea unui număr mic de molecule de DANS în molecula anticorpilor nu determină alterarea activităţii lor imunologice. Acest fapt arată că moleculele de DANS se ataşază de acele regiuni ale moleculei anticorpilor care nu sînt implicate în alcătuirea zonelor de combinare.

În dorinţa de a marca zonele de combinare cu substanţe fluorescente, ca DANS, izotiocianat de fluoresceină, lizamină-rodamină B etc., am recurs la o serie de experienţe în care am urmărit găsirea condiţiilor în care să se realizeze această marcare. Legătura fluorocromului cu proteina fiind de tip covalent, părea indicată căutarea condiţiei de marcare a zonelor prin variaţia pH-ului mediului de reacţie. Clorura de DANS fiind o substanţă cu o solubilitate limitată în mediu apos, era necesară şi stabilirea concentraţiei optime într-un solvent organic electiv, ca acetona sau dioxanul, pentru facilitarea marcării dorite. Variaţia concentraţiei solventului organic permite creşterea cantităţii de fluorocrom adăugat, ceea ce măreşte posibilitatea marcării zonelor de combinare. În sfîrşit, variaţia temperaturii în cursul reacţiei (mai ales creşterea ei) apărea necesară din cel puţin două motive: *a*) modificarea structurii terţiare a anticorpilor cu punerea în evidenţă (la suprafaţă) a zonelor de combinare, *b*) creşterea vitezei de reacţie cu mărirea probabilităţii de combinare.

În consecinţă, s-au efectuat experienţe de fluorocromare a anticorpilor variind patru parametri: temperatura, concentraţia solventului, concentraţia agentului de fluorocromare şi pH-ul mediului de reacţie.

MATERIALE ŞI METODE

Anticorpii. S-au obţinut pe iepuri, prin imunizarea acestora cu albumină serică bovină (BSA), după diferite scheme de imunizare, a căror descriere a fost făcută în altă parte [3]. Antiserurile au fost precipitate cu sulfat de amoniu 33% şi apoi trecute pe DEAE-celuloză, pentru obţinerea unor preparate de IgG pure. Procentul anticorpilor în aceste preparate a variat în jur de 20%. Alte antiseruri folosite au fost: serul de cobai anti-IgG de iepure, preparat de noi; serul de porumbel anti-lanţ H şi anti-lanţ L, preparat de dr. N. St. Chişu de la spitalul „Dr. I. Cantacuzino"; serul de porc anti-iepure (Sevac), obţinut prin bunăvoinţa dr. F. V. Škvařil de la Institutul de seruri şi vaccinuri din Praga.

Fluorocromarea distructivă. În cele ce urmează se va da numai tehnica prin care se realizează inactivarea anticorpilor. La o soluţie de anticorpi 0,1—0,2% în tampon carbonat-bicarbonat 0,2 M, pH 10,5, încălzită la 56°C în baie de apă, s-a adăugat sub agitare şi în porţiuni mici DANS dizolvat în acetonă. Concentraţia DANS-ului a variat între 0,025 şi 0,25 mg/mg de anticorpi, iar volumul de acetonă n-a depăşit 10% din volumul soluţiei de anticorpi. Cuplarea s-a lăsat să se desăvîrşească 2 ore la 56°C.

Determinarea activităţii anticorpilor. Cantitatea de anticorpi rămasă activă după fluorocromare s-a determinat prin tehnica cu imunosorbenţi, după indicaţiile date de Nezlin [4]. S-a folosit MABOM-celuloza (m-aminobenziloximetil), obţinută prin bunăvoinţa dr. R. S. Nezlin de la Institutul de biologie moleculară din Moscova, de care s-a cuplat BSA.

Fragmentarea anticorpilor fluorescenţi. Separarea lanţurilor polipeptidice L şi H s-a făcut după tehnica lui Fahey [5], cu deosebirea că în mediul de reacţie s-a adăugat şi uree 6 M. După reducere şi alchilare, lanţurile s-au separat prin filtrare pe Sephadex G—100, eluţia efectuîndu-se cu un amestec de acid acetic N şi uree 6 M.

Hidroliza lanţului H. S-a făcut cu pepsină, după o tehnică descrisă de V. Gheţie [6]. Separarea fragmentului Fd' de produşii de digestie ai fragmentului Fc s-a realizat prin filtrare pe Sephadex G—50, cu tampon de fosfaţi 0,1 M, pH 8,0.

Determinarea numărului de molecule de DANS fixate pe anticorpi şi diferite fragmente ale acestora. S-au utilizat curbe etalon ridicate cu IgG de iepure, la 280 nm, şi cu DANS, la 320 nm, aşa cum s-a arătat într-o lucrare anterioară [2].

Cromatografia pe hîrtie a aminoacizilor. S-a făcut hidroliza fragmentului Fd' fluorescent cu HCl 6 N, 24 de ore la 100°C. Aminoacizii s-au separat prin tehnica descendentă, utilizînd butanol-acid acetic-apă (4 : 1 : 1). Ca martor s-a folosit DANS-lizină, preparată după indicaţiile lui Deyl şi colab. [7]. Determinările au fost făcute de dr. D. Tănăsescu, de la Institutul de biochimie, căruia îi mulţumim şi pe această cale.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Efectuînd fluorocromarea la pH-ul de 10,5, la care grupările ε-amino ale resturilor de lizină sînt disociate şi atacabile prin DANS, şi la temperatura de 56°C, la care γ-globulinele nu se denaturează dar se depliază parţial (cu revenire la forma nativă prin răcirea soluţiei), şi adăugînd cantităţi din ce în ce mai mari de DANS, s-a realizat inactivarea considerabilă a preparatelor de anticorpi folosite. Cîteva din cele mai semnificative date obţinute sînt prezentate în tabela 1.

Inactivarea anticorpilor de iepure anti-BSA prin creşterea cantităţii de fluorocrom a fost constatată şi de Nairn [8], care, cuplînd anticorpii cu de patru ori mai multă clorură de lizamină-rodamină B decît canti-

Tabela 1

Inhibarea activității imunologice a anticorpilor anti-BSA prin fluorocromare distructivă

Concentrația anticorpilor (g%)	Concentrația DANS (mg DANS/mg anticorpi)	Inhibarea activității imunologice (%)
0,17	0,13	55
0,15	0,15	58
0,17	0,16	59
0,17	0,19	64

tatea optimă, constată că cantitatea de precipitat imun formată la echivalență se reduce cu 20% față de cea obținută cu anticorpi nefluorocromați.

Inactivarea unei părți din anticorpi în condițiile prezentate mai sus se realizează prin legarea unui număr considerabil de molecule de fluorocrom de molecula de anticorp (20 moli DANS/mol anticorp). Fluorocromarea puternică a anticorpilor atrage după sine schimbarea proprietăților fizico-chimice ale acestora. Astfel, mobilitatea electroforetică crește de 3—4 ori. Această creștere este mult mai accentuată decît cea care se observă la marcarea obișnuită a anticorpilor. Analizați prin cromatografie pe DEAE-celuloză, anticorpii fluorocromați au o comportare diferită de a celor nefluorocromați, și anume ei nu pot fi eluați decît la molarități mai crescute și prezintă o eterogenitate care reflectă încărcarea diferită cu DANS a populației moleculare [9].

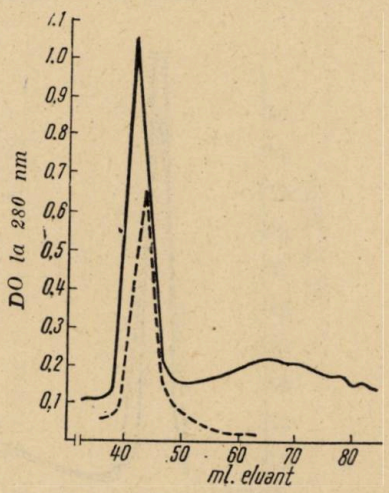


Fig. 1.— Cromatografia pe Sephadex G—100 cu acid acetic N a anticorpilor puternic fluorocromați, reduși și alchilați. Coloană 2/65 cm.
——— cu uree 6M;
– – – fără uree.

Fluorocromarea distructivă nu afectează antigenicitatea moleculei. Anticorpii puternic fluorocromați reacționează cu serurile imune anti-IgG utilizate, formînd o linie de precipitare.

Supuși reducerii, în vederea separării lanțurilor, anticorpii fluorescenți cer prezența unor agenți disocianți mai puternici. De aceea, separarea lanțurilor polipeptidice din molecula anticorpilor puternic fluorocromați nu se poate realiza decît cu uree 6 M (fig. 1).

Repartiția intramoleculară a moleculelor de DANS fixate în molecula anticorpilor și a unităților lor structurale este redată în tabela 2.

Fragmentul Fd′ reacționează cu serul de porumbel anti-H dînd o reacție de identitate parțială cu lanțul H (vezi și [6]). Este de notat însă că această reacție ar putea fi dată și de fragmentul Fc′ [10], de care fragmentul Fd′ nu se separă prin filtrare pe Sephadex G—50.

Din datele prezentate mai sus reiese că lanțul L fixează un număr de molecule de DANS mai mic decît lanțul H. Ținînd seamă de faptul

Tabela 2

Numărul de molecule de DANS fixate în molecula anticorpilor şi a unităţilor lor structurale

IgG	H	L	Fd'
18,67	7,28	2,05	3,45
27,15	7,96	5,60	—
19,20	10,44	—	4,12
16,92	7,28	1,18	—

că capătul N-terminal al lanţului H la iepure este blocat, rezultă că cele 7—10 molecule de DANS trebuie să fie ataşate fie de grupările ε-amino ale resturilor de lizină, prezente în cantitate mare în lanţul H (23 moli lizină/mol lanţ H [11]), fie de grupările guanido sau imino ale argininei, respectiv histidinei şi triptofanului. Nu trebuie exclusă nici posibilitatea fixării DANS-ului de carbohidraţii ataşaţi de lanţul H [6].

Jumătate din cantitatea de fluorocrom ataşată de lanţul H se găseşte în porţiunea sa N-terminală, şi anume pe fragmentul peptic Fd'.

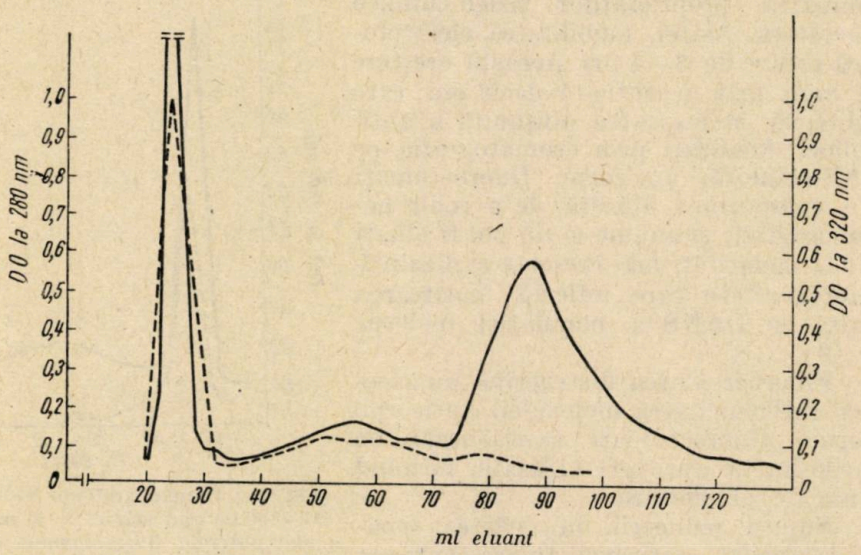


Fig. 2. — Cromatografia pe Sephadex G—50 cu tampon de fosfaţi 0,1 M, pH 8,0 a lanţului H hidrolizat cu pepsină. Coloană 1,5/42 cm.

—— 280 nm;
– – – 320 nm.

Cum unii autori [12] înclină să atribuie acestui fragment un rol principal la alcătuirea zonelor de combinare, pare probabil ca cel puţin o parte din moleculele fixate în acest fragment să pătrundă în zona de combinare.

Ştiind că la fluorocromarea în condiţii blînde, care nu afectează activitatea imunologică, în fragmentul Fd' al unei părţi din populaţia de IgG se ataşază o moleculă de DANS spre capătul C-terminal (lizina sau carbohidratul din regiunea flexibilă), rezultă că, în experimentul nostru, una sau maximum trei molecule de DANS blochează zona de com-

binare. Identificarea ei în fragmentul Fd' este dependentă de avansarea cunoștințelor noastre în domeniul secvenței aminoacizilor în această porțiune a moleculei.

Analiza cromatografică a aminoacizilor rezultați prin hidroliza acidă a fragmentului Fd' fluorescent evidențiază două spoturi fluorescente (în afară de cel pentru DANS liber), între care unul are un R_F mare, asemănător DANS-lizinei. Singer [13] a arătat că restul de lizină este foarte important pentru activitatea imunologică a anticorpilor de iepure anti-BSA. Ar părea deci că reducerea activității imunologice se datorește legării DANS-ului de resturile de lizină care se găsesc în fragmentul Fd' și care, la rîndul lor, sînt necesare pentru activitatea anti-BSA a anticorpilor studiați.

CONCLUZII

La fluorocromarea cu clorură de DANS a anticorpilor anti-BSA în condiții speciale de temperatură, pH și concentrație a reactanților, s-a constatat că :

1) se distruge 60% din activitatea anticorpilor,

2) pe o moleculă de anticorp se fixează, în medie, 20 de molecule de DANS,

3) fragmentul Fd' conține, în medie, 4 molecule de DANS, care pot fi legate de resturile de lizină din acest fragment.

Prezentată la redacție la 5 aprilie 1968

Institutul de biochimie
al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. C. Șelariu, V. Gheție, S. Mihăescu, *Hidroliza cu papaină a γ_2-globulinelor și anticorpilor fluorescenți de iepure*, St. cerc. biochim., **8**, 99 (1965).
2. S. Mihăescu, *Distribution of 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonic acid in the polypeptide chains of rabbit γG-globulin*, Rev. roum. Biochim. **4**, 41 (1967).
3. V. Gheție, S. Mihăescu, L. Buzilă, *Utilizarea cromatografiei de excludere moleculară la izolarea și purificarea anticorpilor din precipitatele imune fluorescente*, St. cerc. biochim, **10**, 325 (1967).
4. R. S. Nezlin, *Biohimiia antitel*, Izdatelstvo Nauka, Moscova, 1966, p. 12.
5. J. L. Fahey, *Structural basis for the differences between type I and II human γ-globulin molecules*, J. Immunol. **91**, 448 (1963).
6. V. Gheție, *The localization of 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonic acid in Fd and Fd' fragments of rabbit IgG*, Rev. roum. Biochim. **5**, 121 (1968).
7. Z. Deyl, J. Rosmus, *Thin layer chromatography of Dansyl amino acid derivatives*, J. Chromatogr. **20**, 514 (1965).
8. R. C. Nairn, *Fluorescent protein tracing*, Livingstone LTD., Edinburg—London, 1962, p. 53, fig. 3, 6.

9. J. J. Cebra, G. Goldstein, *Chromatographic purification of tetramethylrhodamine-immune globulin conjugates and their use in the cellular localization of rabbit γ-globulin polypeptide chains*, J. Immunol. **95**, 230 (1965).
10. M. W. Turner, H. Bennich, *Subfragments from the Fc fragment of human IgG*, Biochem. J. **107**, 171 (1968).
11. R. R. Porter, *Chemical structure of γ-globulin and antibodies*, Brit. med. Bull. **19**, 197 (1963).
12. O. A. Roholt, G. Radzinski, D. Pressman, *Specificity in the combination of Fd fragments with L chains to form hapten-binding sites*, J. exp. Med. **123**, 921 (1966).
13. S. J. Singer, *Physico-chemical studies on the nature of antigen-antibody reactions*, J. cell. comp. Physiol. **50** (suppl. 1) 51 (1966).

ANTIBODIES INACTIVATION BY FLUORESCENT LABELLING

SUMMARY

The experimental conditions of pH, temperature and DANS concentration, in which the immunological activity of the anti-BSA antibodies was diminished were established.

The intramolecular distribution of DANS in the molecule of strong labelled antibodies and in some fragments derived from them is shown; it was found that the Fd′ fragment binds a considerable amount of DANS. Paper chromatography of the aminoacids showed that DANS might be fixed on the lysine residues of the Fd′ fragment.

ST. CERC. BIOCHIM. 11, 3, 287 – 293 (1968)

CONTRIBUȚII LA BIOSINTEZA CAROTINOIDELOR

II. BIOSINTEZA CAROTINOIDELOR DIN *AGLAONEMA COMMUTATUM* SCHORT

GAVRIL NEAMȚU și CORNEL BODEA

561.19:577.1

Rezumat. — S-au determinat la *Aglaonema commutatum* pigmenții carotinoidici din semințe, frunze, flori și fructe în diferite faze de coacere. Pigmentul principal din fructele coapte este licopina, alături de care s-au identificat unii pigmenți secundari, dintre care 4-ceto-3′-hidroxi-licopina reprezintă o nouă carotinoidă. În frunze și în fructele verzi raportul dintre α- și β-carotină este 1:3, iar în fructele galbene este 1 : 1. Din rezultatele obținute privind dinamica biosintezei pigmenților carotinoidici reiese că la această specie sediul proceselor de biogeneză a principalelor carotinoide nu este mugurele floral, ci fructul în diferite faze de coacere.

Spre deosebire de frunze și semințe, pigmenții carotinoidici din flor și fructe sînt mult mai variați. Dintre plantele cu carotenogeneză bogată la nivelul florilor amintim speciile : *Calendula officinalis Laburnum anagyroides*, *Cytisus scoparius*, *Lotus corniculatus*, *Tagetes patula*, *Tragopogon pratensis*, *Viola tricolor* etc. [1].

Conținutul pigmenților carotinoidici nu depinde în general de culoarea florilor. Între specii cu același colorit floral există atît deosebiri calitative, cît și cantitative [6] Pînă în prezent se cunosc foarte puține plante care să conțină aceleași carotinoide atît în flori cît și în fructe [3], [4]. La majoritatea plantelor nu există o dependență a carotinoidelor din fructe față de carotinoidele din flori. Astfel, unele specii din genurile *Rosa*, *Rubus*, *Convallaria*, *Solanum*, *Citrus* etc. conțin în flori un număr mic de carotinoide, mai frecvent β-carotina și luteina, în timp ce fructele lor prezintă o carotenogeneză bogată [1], [11]. În mod asemănător se comportă și speciile din genul *Aglaonema*.

Speciile genului *Aglaonema* nu cresc spontan în flora țării noastre. Ele sînt plante ornamentale, cultivate în țara noastră în sere, la temperaturi relativ ridicate și constante, de 28—30°C. Aceste plante cresc spontan în regiunile tropicale și au o perioadă lungă de înflorire.

Din cercetările anterioare privind pigmenții carotinoidici la unele specii din genul *Aglaonema* [5], [10], [11] se cunoaște că acestea conțin în fructe licopină. Întrucît cercetearea carotinoidelor la aceste specii s-a făcut la începutul secolului al XX-lea, cînd metodele cromatografice nu erau perfecționate, nu s-au pus în evidență și carotinoidele secundare.

În prezenta lucrare noi am cercetat atît pigmenții carotinoidici principali și secundari din diferite organe ale speciilor *Aglaonema commutatum* și *Aglaonema costatum*, cît și dinamica biosintezei carotinoidelor din fructe, în diferite faze de coacere.

MATERIAL ȘI METODE

S-a lucrat cu material proaspăt recoltat în decursul anului 1966 din serele Grădini botanice din Cluj. Din fructele coapte s-au utilizat 2 kg, iar din fructele necoapte, flori, frunze și semințe, cantități mai mici. Extragerea pigmenților din material s-a făcut cu eter de petrol-acetonă, în proporția de 7 : 3, iar coloana cromatografică s-a developat cu amestec de eter de petrol-benzen-acetonă, în proporția de 85 : 13 : 2.

Pentru identificarea și determinarea pigmenților carotinoidici s-au folosit aceleași metode ca și în lucrările anterioare [7], [8].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În semințele de *Aglaonema commutatum* s-a identificat numai luteina, în cantitate de 1,20 mg/100 g material proaspăt.

Tabela 1

Determinarea carotinoidelor foliare din Aglaonema commutatum (mg/100 g material proaspat)

Carotinoide determinate	Epoca de recoltare a frunzelor		
	înainte de înflorire	după înflorire	Cînd planta are fructe coapte
α-carotina	0,40	0,35	0,25
β-carotina	1,05	0,90	0,70
criptoxantina	0,15	0,15	0,10
luteina	1,60	1,55	1,31
violaxantina	0,35	0,30	0,25
neoxantina	0,20	0,20	0,15
Total carotinoide	3,80	3,45	2,76

În frunze, pe lîngă carotinoidele foliare comune, apare ca un aspect caracteristic α-carotina, în cantitate relativ mare. Raportul dintre α- și β-carotină este de 1 : 3. Determinarea cantitativă a carotinoidelor foliare este trecută în tabela 1.

Pigmenții foliari variază relativ puțin cu îmbătrînirea frunzelor. Întrucît frunzele acestei specii sînt mari și suculente, cantitatea de α-carotină dintr-o frunză este, în medie, de 2 mg.

În mugurii florali în diferite faze de creştere, carotinoidele foliare s-au identificat în cantitate relativ mai mică.

Florile au petale de culoare albă şi conţin numai luteină şi β-carotină.

Partea cea mai bogată în carotinoide la această plantă este fructul în diferite faze de coacere. Cromatograma carotinoidelor din fructele coapte se prezintă în tabela 2.

În fructele coapte se constată o predominare a carotinoidelor cu structură aciclică şi pseudociclică, ce conţin un număr mai mare de duble

Tabela 2

Cromatograma carotinoidelor din fructele coapte de Aglaonema commutatum mg/100 g material proaspăt (50×5 cm)

Lăţimea zonei în cm	Culoare	Carotinoide	Maxime de absorbţie în eter de petrol mμ	mg/100 g material proaspăt
1,2	galben-canar	violaxantină (ester)	475, 445	1,30
0,6	violet-deschis	4-ceto-3′-hidroxi-licopina (ester)	522 492 450	0,70
3,0	roşu-deschis	licoxantina (ester)	503, 472 444	2,00
0,5	interzonă			
9	roşu intens	licopina	503, 472, 444	6,00
0,3	galben	neidentificat		
3,0	portocaliu	γ-carotina	492,460	0,56
1,0	portocaliu-deschis	δ-carotina	490, 458	0,10
0,5	interzonă			
4,5	portocaliu	β-carotina	480, 450	1,83
0,5	interzonă			
2,0	galben	α-carotina	475, 445	0,34

legături conjugate şi imprimă fructelor coapte un colorit-portocaliu-roşiatic. Dintre factorii de mediu care influenţează mai mult asupra formării acestor pigmenţi, un rol important credem că revine temperaturii relativ ridicate şi cantităţii mici de radiaţii ultraviolete. Prin faptul că *Aglaonema commutatum* a fost crescută tot timpul anului în seră, a absorbit foarte puţine radiaţii ultraviolete, şi n-a suferit variaţii mari de temperatură. De altfel şi plantele spontane care conţin carotinoide cu sistem polienic bogat înfloresc primăvara mai tîrziu, cînd temperatura este mai ridicată.

Pigmenţii carotinoidici din speciile genului *Aglaonema* sînt total diferiţi de carotinoidele din plantele ce cresc în regiuni montane, subalpine şi alpine, unde temperaturile sînt relativ joase şi cantitatea de radiaţii

ultraviolete este mai mare. La speciile din aceste regiuni predomină carotinoidele oxigenate, cu structură α-iononică [9].

În fructele coapte de *Aglaonema commutatum* pigmentul principal este licopina, alături de care se găsesc în cantitate mai mare licoxantina, γ- și β-carotina, iar dintre pigmenții secundari, δ- și α- carotina. În general, în fructele acestei specii carotinoidele hidrocarburice predomină față de cele oxigenate. Dintre epoxizi s-a identificat numai violaxantina, *Aglaonema commutatum* deosebindu-se și sub acest aspect de plantele ce cresc la altitudini mai mari, unde predomină xantofilele și epoxizii.

În fructele coapte s-a pus în evidență și o ceto-hidroxicarotinoidă care prezintă în vizibil maxime de absorbție la 522, 492, 450 mμ, iar în IR un maxim de absorbție în regiunea 1050 cm^{-1}, caracteristic hidroxilului nealilic, un maxim la 1670 cm^{-1}, caracteristic grupării cetonice și un maxim la 1750 cm^{-1}, caracteristic legăturii esterice (2). Înainte de saponificare, această carotinoidă are în hexan-metanol 95% o repartiție 15% hipofazică, iar după saponificare una 70% hipofazică. După saponificare ea trece la spălare în mediu apos, datorită formării unor săruri solubile, iar după adăugare de acid acetic pînă la un pH acid pigmentul trece în epifază. Într-un amestec de hexan-metanol 95%, la zona de separație apare un inel violaceu, caracteristic cetonelor.

Pe baza poziției în coloana de absorbție, a culorii, a spectrului de absorbție în vizibil și IR, după repartiția în hexan-metanol 95%, înainte și după saponificare, noi considerăm că acest pigment este o nouă carotinoidă, și anume : 4-ceto-3′-hidroxilicopina (fig. 1).

Acest pigment are spectrul de abdorbție mai ridicat decît spectrele de absorbție ale carotinoidelor cu 12 duble legături conjugate. Deplasarea

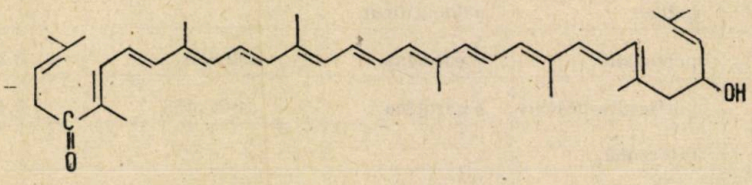


Fig. 1

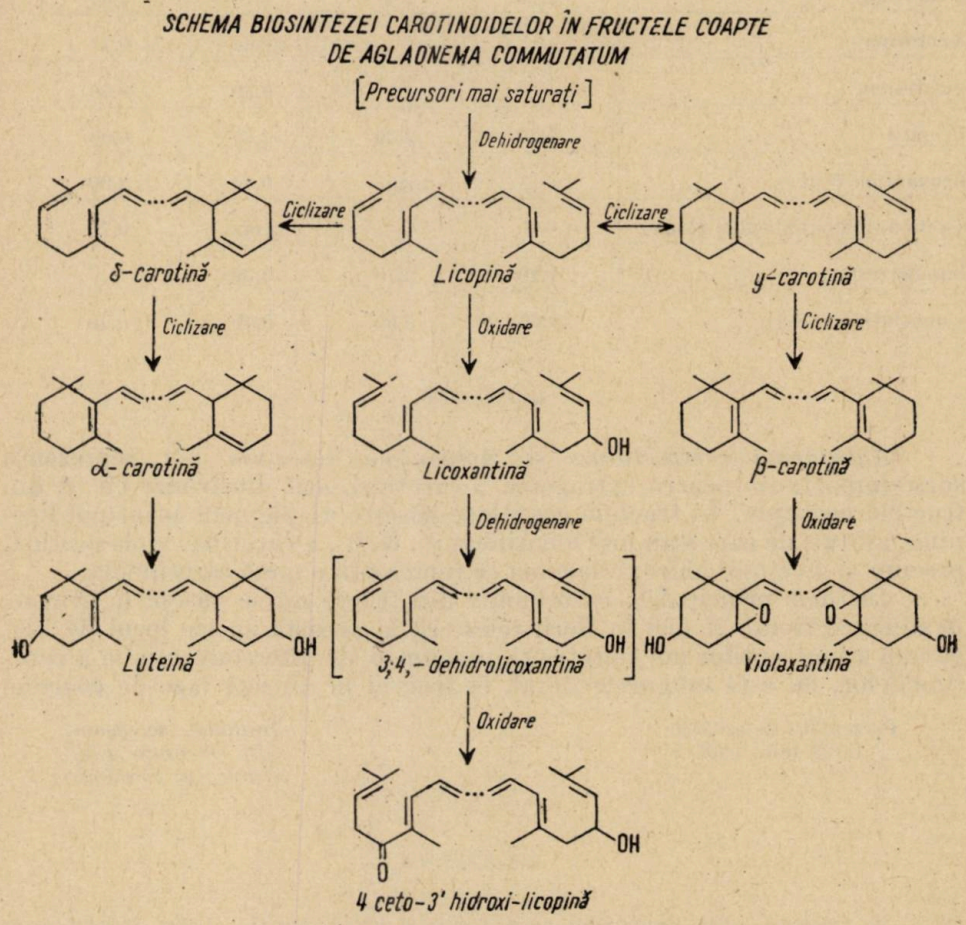
batocromă a spectrului de absorbție se datorește, probabil, deplasării electronilor π dintre carbonii C_1 și C_2, între carbonii C_2 și C_3, ceea ce face ca sistemul polienic să crească cu încă două duble legături, dacă ținem seama și de conjugarea grupării cetonice.

Din determinarea pigmenților carotinoidici la fructele în diferite faze de coacere (tabela 3), reiese că la această specie apar unele aspecte noi în ce privește locul de formare a principalelor carotinoide. Majoritatea carotinoidelor din fructe nu se găsesc în frunze, și nici în flori. Locul de biogeneză a pigmenților noi sintetizați, precum și cel de interconversiune a carotinoidelor, nu mai este mugurele floral, ci fructul în diferite faze de coacere.

În timpul coacerii fuctelor are loc o micșorare mai accentuată a pigmenților de culoare galbenă (α-carotina, luteina, violaxantina) și o creștere a carotinoidelor cu structură aciclică și pseudoiononică, care imprimă

fructelor coapte un colorit portocaliu-roşietic. În fructele necoapte, α-carotina se găseşte în cantitate mai mare decît în fructele coapte. În fructele galbene, raportul dintre α- şi β-carotină este aproape de 1 : 1.

În frunzele şi în fructele coapte de *Aglaonema costatum* s-au identificat aceleaşi carotinoide ca şi la *Aglaonema commutatum*, deosebirile fiind numai de ordin cantitativ şi nesemnificative.



Schema nr. 1

Ţinînd seama de natura pigmenţilor carotinoidici identificaţi în fructele coapte, propunem următoarea schemă de biogeneză a carotinoidelor. Pigmenţii din paranteză n-au putut fi identificaţi, dar se presupun a fi etape intermediare în procesul de biogeneză.

Tabela 3

Determinarea carotinoidelor din fructele de Aglaonema commutatum în diferite faze de coacere (mg/100 g material proaspăt)

Carotinoide	Fructe verzi-gălbui	Fructe galbene	Fructe portocalii	Fructe roșii
α-carotina	0,85	2,15	1,50	0,35
β-carotina	2,70	2,40	2,10	1,83
δ-carotina	—	—	urme	0,10
γ-carotina	—	—	0,30	0,56
licopina	1,00	2,30	4,60	6,00
licoxantina (ester)	—	urme	0,70	2,00
4-ceto-3′-hidroxi-licopina (ester)	—	—	urme	0,76
luteina (ester)	1,20	0,70	0,30	—
violaxantina (ester)	0,60	0,60	0,40	0,40

CONCLUZII

Aglaonema commutatum și *Aglaonema costatum* pot reprezenta surse importante pentru extragerea α-carotinei, atît din frunze cît și din fructele necoapte. În fructele coapte se găsește ca pigment principal licopina, alături de care s-au mai identificat γ-, δ-, β-, α-carotina, violaxantina, precum și 4-ceto-3′-hidroxi-licopina ce reprezintă o nouă carotinoidă.

Întrucît principalele carotinoide din fructe nu se găsesc în frunze, în mugurii florali și nici în flori, reiese că la această specie locul de biogeneză a pigmenților noi sintetizați, precum și de interconversiune a carotinoidelor, nu este mugurele floral, ci fructul în diferite faze de coacere.

Prezentată la redacție
la 22 iulie 1967

Institutul agronomic
„Dr. P. Groza" Cluj
Catedra de biochimie

BIBLIOGRAFIE

1. T. W. Goodwin, *The comparative biochemistry of the carotenoids* (1952). Traducere în l. rusă, Moscova, 1954.
2. T. W. Goodwin, *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Academic Press, London—New York, capitol III, p. 75 (1965).
3. R. Kuhn u. H. Saloman, *Pflanzenfarbstoffe. XXIII. Xanthophyll aus Löwenzahnblüten.* Helv. Chim. Acta **13**, 1063 (1930).
4. R. Kuhn, A. Winterstein u. H. Roth, *Über den Polyenfarbstoff der Azafranillowurzeln*, Ber. dtsch. chem. Ges. **64**, 333 (1931).
5. B. H. Liubimenko, Rev. gen. Bot. **25**, 475 (1914).
6. G. Neamțu, V. Tămaș u. C. Bodea, *Untersuchungen über Farbtsoffe aus endemischen Pflanzen. III. Die Carotinoide aus Rannunculus carpaticus und Doronicum carpaticum*, Rev. roum Biochim. **4**, p. 59—65 (1967).

7. G. Neamțu, V. Tămaș u. C. Bodea, *Die Carotinoide aus einigen Adonis-Arten*, Rev. roum. Biochim. **3**, p. 305–310 (1966).
8. V. Neamțu și C. Bodea, *Contribuții la biogeneza carotinoidelor I. Biogeneza carotinoidelor din Astragalus peterfii și Adonis aestivalis*, St. cerc. biochim. (1968).
9. G. Neamțu, *Cercetări privind biochimia și fiziologia pigmenților carotinoidici din fanerogane de diferite tipuri fiziologice și ecologice. Teză de doctorat*, Biblioteca de Fiziologie vegetală a Univ. Cluj, 1967.
10. C. Van Vissehingh, *Über die Nachweisung und das Vorkommen von Carotinoiden in den Pflanzen*. Flora, Jena **7**, 371 (1915).
11. L. Zechmeister, *Carotinoide*, Berlin, Verlag Julius Spinger 1934.

CONTRIBUTIONS TO CAROTENOIDS BIOSYNTHESIS. II. CAROTENOIDS BIOSYNTHESIS FROM *AGLAONEMA COMMUTATUM* SCHORT

The carotenoid pigments of the seeds, leaves, flowers and fruits of *Aglaonema commutatum* Schort in various stages of ripening were determined. The main pigment of the ripe fruits is the lycopene beside which some minor pigments were identified among with the 4-keto-3′-hydroxy-lycopene represents a new carotenoid. In leaves and in green (unripe) fruits the ratio between α- and β-carotene is 1 : 3, and in yellow fruits it is 1 : 1. The results concerning the dynamic biosynthesis of the carotenoid pigments show that with this species the centre of biogenesis processes of the main carotenoids is not the floral but the fruit in its various stages of ripening.

ST. CERC. BIOCHIM., **11**, 3, 295–304 (1968)

INFLUENȚA NATURII ȘI CONCENTRAȚIEI ALIMENTULUI AZOTAT ASUPRA MERSULUI FERMENTAȚIEI BUTIRICE

LIDIA POPA

Rezumat. — S-a urmărit influența naturii și concentrației alimentului azotat asupra fermentației butirice din punct de vedere al morfologiei celulelor bacteriene, al mersului fermentației și al produșilor obținuți. Ca aliment azotat s-au folosit : $(NH_4)_2SO_4$, peptonă, amestec de $(NH_4)_2SO_4$ și peptonă, asparagină, fiecare în două concentrații (0,1 g și 0,5 g%) și de asemenea, alanină și triptofan, fiecare în concentrație de 0,1 g%. Raportat la N, aceasta revine la 0,0212 g N pentru variantele cu 0,1 g% substanță azotată și 0,106 g N pentru variantele cu 0,5 g% substanță azotată.

S-a constatat că $(NH_4)_2SO_4$ și peptona, în concentrație de 0,5 g% asigură cel mai bine dezvoltarea normală a celulelor bacteriene și sporularea lor la sfîrșitul fermentației.

Din punct de vedere al produșilor de fermentație, cele mai potrivite surse azotate sînt peptona, alanina și triptofanul, în concentrație de 0,1 g%, care determină creșterea cantității de acid butiric, scăderea cantității de acid acetic și de produși secundari neutri. Rezultate destul de bune în același sens se obțin și cu $(NH_4)_2SO_4$ + peptonă în concentrație de 0,1 g%. Creșterea concentrației de aliment azotat peste valoarea 0,1 g% nu este indicată, deoarece determină scăderea cantității de acid butiric, creșterea cantității de acid acetic și de produși secundari neutri.

Datele existente în literatură în legătură cu această problemă nu sînt prea numeroase și se referă, aproape toate, la influența naturii alimentului azotat asupra creșterii și sporulării bacteriilor butirice (*Cl. butyricum*, *Cl. pasteurianum*). Majoritatea autorilor susțin că pentru o creștere și sporulare normală, *Cl. butyricum* are nevoie de azot organic, care după Azova [1] poate fi dat ca peptonă sau un amino-acid, după Bergère și Hermier [3] ca tripticază, iar după Heer și Bachofen [7] ca un produs mai complex, cum este de exemplu extractul de carne. Numai asupra lui *Cl. pasteurianum* datele sînt contradictorii. Astfel Vinogradski [9] susține că pe medii bogate în azot, în special organic, *Cl. pasteurianum* degenerează și nu mai sporulează. Emțev [6], dimpotrivă, arată că degenerarea culturilor de *Cl. pasteurianum* are loc tocmai în medii lipsite de sursă de azot.

În ce privește posibilitatea folosirii unei surse minerale de azot, datele sînt foarte rare. Unii autori, ca de pildă Azova [1], neagă capacitatea bacteriilor butirice de a se dezvolta pe o sursă de azot mineral, deși

autoarea recunoaşte că respectiva constatare se referă la tulpina de *Cl. butyricum* cu care a lucrat, ceea ce duce la presupunerea că lucrurile pot merge altfel cu alte tulpini de bacterii butirice.

Cît priveşte influenţa pe care alimentul azotat ar putea-o avea asupra produşilor de fermentaţie, există o singură referire în acest sens, şi anume a lui Vinogradski [9], care, într-o experienţă cu *Cl. pasteurianum*, a observat că peptona influenţează favorabil producerea de acid butiric. Repetînd însă experienţa, n-a mai obţinut aceleaşi rezultate, încît el pune sub semnul întrebării această constatare.

Lucrarea de faţă îşi propune să stabilească în ce măsură concentraţia şi natura alimentului azotat pot influenţa morfologia celulelor bacteriene, mersul fermentaţiei şi produşii obţinuţi.

MATERIAL ŞI METODE

Cultura: o cultură de *Clostridium pasteurianum*, izolată de noi din sol, după metoda I. Voicu [11], însă fără folosirea miceliului de *A. niger*, şi notată cu A_2. Cultura a fost izolată la 26.II.1966 şi păstrată sub formă sporulată, iniţial pe suspensie sterilă de sol, şi apoi în ghips, după metoda I. Voicu [12]. S-a ales pentru conservare această metodă, deoarece, pe de o parte, ea reproduce în mare măsură condiţiile de conservare pe nisip steril, folosite în industrie pentru bacteriile butirice, iar pe de altă parte pentru că s-a constatat că în aceste condiţii bacteriile butirice nu degenerează, păstrîndu-şi intactă capacitatea de fermentaţie. În intervalul de timp cuprins între izolarea culturii şi montarea experienţei de faţă, s-au făcut două pasaje pe mediu de fermentaţie butirică, pentru acomodare, la ultimul determinîndu-se şi produşii de fermentaţie. Înainte de trecerea în ghips, pentru păstrare, cultura sporulată era în mod obligatoriu pasteurizată la 80°C, timp de 15 minute, pentru omorîrea formelor vegetative degenerate [6]. Cultura prezenta microscopic toate caracteristicile corespunzătoare ciclului de evoluţie descris de Vinogradski la *Clostridium pasteurianum* [9]. Pentru controlul culturii s-a făcut, la un an de zile de la izolarea ei, proba fixării azotului, după metoda indicată de Vinogradski [8]. Proba a fost pozitivă.

Dăm mai jos caracteristicile tulpinii *Cl. pasteurianum* A_2 în ce priveşte produşii de fermentaţie:

Acid butiric (mg/100 ml mediu) — 575,1
Acid acetic (mg/100 ml mediu) — 223,2
Acid butiric/acid acetic (B/A) — 2,6
Alcool butilic (mg/100 ml mediu) — 10,1
Alcool etilic (mg/100 ml mediu) — 13,3
Acetonă (mg/100 ml mediu) — 1,4
Datele reprezintă media a trei determinări consecutive.

Mediul de cultură: s-a folosit un mediu sintetic de compoziţia următoare: glucoză — 3 g; K_2HPO_4 — 0,05 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,05 g; NaCl — 0,05 g; apă de robinet — 100 ml. Alimentul azotat calculat la 100 ml mediu de cultură s-a utilizat în următoarele variante:

— $(NH_4)_2SO_4$ — 0,1 g şi 0,5 g (adică 0,0212 g şi 0,106 g N)
— peptona — 0,1 g şi 0,5 g
— $(NH_4)_2SO_4$ + peptonă — 0,1 g şi 0,5 g (luate împreună)
— D—L asparagină — 0,1 g şi 0,5 g
— D—L alanină — 0,1 g
— D—L triptofan — 0,1 g

S-a folosit peptonă Riedel de Haën A. G., asparagină Fluka, alanină E. Merck și triptofan Chinoin.

S-a calculat cîtă substanță trebuie adăugată în mediu în fiecare caz, pentru a avea aceeași concentrație în N ca la $(NH_4)_2SO_4$. Acest calcul s-a făcut pentru asparagină, alanină și triptofan pe baza greutății lor moleculare, iar pentru peptonă pe baza faptului că posedă 16% N. Mediul s-a repartizat în sticle Soxhlet de 250 ml capacitate, cîte 150 ml, și s-a sterilizat la 115°C, timp de 20 de minute. Toate probele s-au făcut în dublu.

Însămînțarea: fiecare probă s-a însămînțat cu 10 ml cultură de *Cl. pasteurianum* A_2, pregătită în prealabil în felul următor: din cultura păstrată în ghips s-a însămînțat un mediu de cultură de aceeași compoziție ca mai sus, cu 3 g% glucoză și 0,1 g% $(NH_4)_2SO_4$. După șase zile de fermentare, cînd cultura a început să sporuleze și fermentația a slăbit, s-a trecut la însămînțarea probelor de experiență. După însămînțare, în toate probele s-au adăugat 2 g $CaCO_3$ steril. În cursul fermentației s-a mai adăugat $CaCO_3$ steril în probele în care s-a constatat consumarea lui, și anume:

— $(NH_4)_2SO_4$ — 0,1 g% — pr. I — 0,5 g $CaCO_3$
pr. II — 1,0 g „
— $(NH_4)_2SO_4$ — 0,5 g% — ambele probe — cîte 0,25 g $CaCO_3$
— asparagină — 0,1 g% — ambele probe cîte 0,5 g $CaCO_3$
— asparagină — 0,5 g% — ambele probe cîte 0,5 g $CaCO_3$
— triptofan — 0,1 g% — ambele probe cîte 0,25 g $CaCO_3$.

Sticlele respective, prevăzute cu un mic ventil pentru eliminarea gazelor, au fost puse la termostat la temperatura de 37°C. Imediat după însămînțare, într-o probă din mediul fermentat rămas s-a determinat aciditatea volatilă adusă în mediu cu cei 10 ml săminț, ținîndu-se cont de ea în calcul.

DETERMINĂRI FĂCUTE ÎN MEDIUL FERMENTAT

1) pH-ul.

2) zahărul rămas neconsumat; proba calitativă după metoda Bertrand [5].

După aceste determinări, mediul fermentat s-a măsurat și s-a neutralizat cu NaOH N în oarecare exces. S-a trecut totul într-un balon de distilare și s-a distilat exact 100 ml, care conțin produșii neutri ai fermentației. În acest distilat s-a determinat:

3) acetona după metoda Messinger [4] [2],

4) alcoolul butilic și etilic după metoda Johnson [4].

Lichidul rămas după îndepărtarea produșilor neutri s-a acidificat intens cu H_2SO_4 1 : 3, în prezență de cristal-violet ca indicator, și s-a antrenat cu vapori de apă pînă la epuizare [4]. În antrenatul obținut s-au determinat principalii acizi volatili (butiric și acetic), după metoda Virtanen și Pulki [4], [10].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Aspecte morfologice

Pe $(NH_4)_2SO_4$, peptonă, $(NH_4)_2SO_4$ în amestec cu peptonă și asparagină, evoluția culturilor este normală, ele sporulînd la sfîrșitul fermentației.

Se observă că la 24 h de la însămînțare peptona determină formarea unor culturi omogene, cu forme vegetative viguroase. Se mai observă că

sporulare în masă se obține pe $(NH_4)_2SO_4$—0,5 g% și peptonă 0,5 g% (fig. 1).

Pe alanină, culturile sînt mai puțin viguroase, neomogene, iar sporularea este rară.

Pe triptofan, aspectul culturii este diferit de toate celelalte. Formele vegetative sînt curioase și anormale : unele scurte și groase, altele lungi și subțiri, unele încovoiate, altele încolăcite, iar la sfîrșit cultura este complet nesporulată (fig. 2).

Rezultă că, din punct de vedere al dezvoltării morfologice normale a celulelor, peptona este alimentul azotat cel mai favorabil, urmată de $(NH_4)_2SO_4$ în concentrația de 0,5 g%. Pentru sporulare, concentrațiile de 0,5 g% sînt mai favorabile, ceea ce concordă cu rezultatele lui Bergère și Hermier [3] care, lucrînd cu *Cl. butyricum* și folosind ca aliment azotat tripticaza, am găsit că de la concentrația de 0,1 g% pînă la 0,5 g% numărul de celule sporulate, practic, se dublează.

Nu se observă apariția de forme de degenerescență la cultivarea lui *Cl. pasteurianum* pe peptonă, așa cum susține Vinogradski [8]. Poate că lucrul acesta se întîmplă la păstrarea îndelungată a bacteriilor pe astfel de medii, în special solidificate cu agar, știut fiind că, spre deosebire de majoritatea bacteriilor, care se conservă bine pe medii solide, bacteriile butirice se conservă mai bine pe medii lichide [4]. În ce privește folosirea în mediu a aminoacizilor, în locul peptonei, așa cum recomandă Azova [1], ea nu este prea favorabilă, cel puțin pentru aminoacizii încercați de noi, și în nici un caz nu se compară cu peptona, lucru recunoscut de altfel și de Azova.

Mersul fermentației este redat în tabela 2, în care se vede evoluția în timp a intensității fermentației, apreciată după grosimea spumei produse de gazele formate. Se observă că mărirea concentrației de aliment azotat din mediu de la 0,1 g% la 0,5 g% determină scurtarea duratei de fermentație, care poate ajunge la jumătate la probele cu peptonă — 0,5 g% și și $(NH_4)_2SO_4$ + peptonă — 0,5 g%.

La aceeași concentrație de aliment azotat, se remarcă durata mai lungă a fermentației la probele cu alanină (10 zile) și cea excepțional de lungă la cele cu triptofan (22 zile).

Maximul de fermentație se situează, la majoritatea probelor, la 24—48 h de la însămînțare, cu excepția probelor cu alanină și triptofan, la care el apare mai tîrziu (după 4 și respectiv 7 zile de la însămînțare). Valoarea maximului este foarte mare, anume 8 cm, la probele cu peptonă — 0,5 g% și $(NH_4)_2SO_4$ + peptonă — 0,5 g%. Aspectul spumei este și el variabil : la majoritatea probelor spuma este densă la început, iar spre sfîrșitul fermentației devine mai rară. Excepție fac probele cu triptofan, la care spuma e foarte densă și se menține astfel pînă la sfîrșitul fermentației, apoi probele cu asparagină, la care spuma este mai rară, și probele cu alanină, la care spuma este foarte rară.

Zahăr neconsumat la sfîrșitul fermentației nu s-a constatat.

pH-ul la sfîrșitul fermentației. Din tabela 1 se observă că la probele cu peptonă 0,1 g%, asparagină 0,1 g%, alanină 0,1 g% și triptofan 0,1 g%, pH-ul este 7, deși numai la asparagină și triptofan, s-a adăugat $CaCO_3$ în plus față de cele 2 g adăugate inițial. La celelalte probe, pH-ul

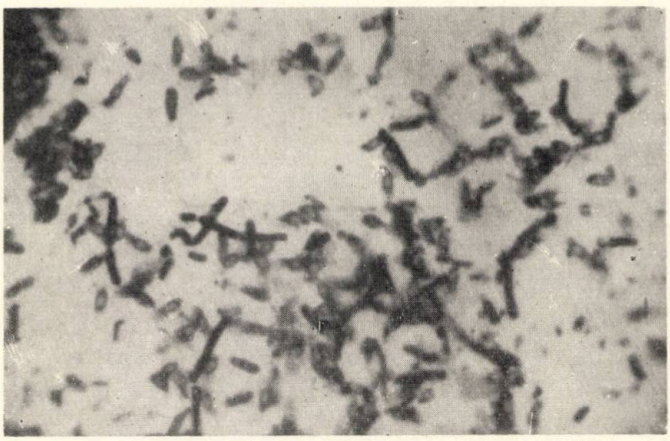


Fig. 1. — Aspectul culturii pe mediu cu $(NH_4)_2SO_4$ — 0,5g% la sfîrşitul fermentaţiei. Se observă sporulare în masă.

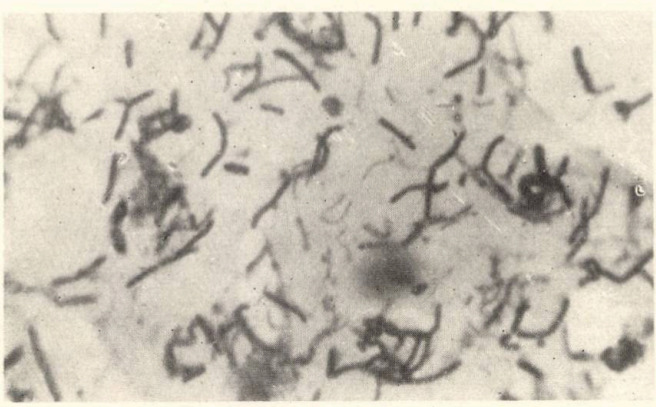


Fig. 2. — Aspectul culturii pe mediu cu triptofan — 0,1g% la sfîrşitul fermentaţiei. Se observă numai forme vegetative, cu aspect anormal, nesporulate.

Tabela 1

Valorile pH-ului la sfîrșitul fermentației *)

Variante	pH final
$(NH_4)_2SO_4$ — 0,1 %	5,8
$(NH_4)_2SO_4$ — 0,5 %	5,5
Peptonă — 0,1 %	7,0
Peptonă — 0,5 %	6,1
$(NH_4)_2SO_4$ + peptonă — 0,1 %	6,0
$(NH_4)_2SO_4$ + peptonă — 0,5 %	5,5
Asparagină — 0,1 %	7,0
Asparagină — 0,5 %	5,8
Alanină — 0,1 %	7,0
Triptofan — 0,1 %	7,0

*) pH inițial = 6,6

Tabela 2

Influența naturii și concentrației alimentului azotat asupra mersului fermentației butirice, apreciat după grosimea spumei (cm) (media din 2 probe paralele)

Zile de fermentație	Sursa de azot									
	$(NH_4)_2SO_4$		Peptonă		$(NH_4)_2SO_4$ + peptonă		Asparagină		Alanină	Triptofan
	0,1 g	0,5 g	0,1 g	0,5 g	0,1 g	0,5 g	0,1 g	0,5 g	0,1 g	0,1 g
1	0,5	0,5	1,8	8,0	1,45	8,0	0,5	0,5	0,5	0,3
2	4,25	3,75	2,75	3,5	5,0	3,75	2,5	2,65	1,25	1,0
3	2,0	0,5	1,55	0,3	3,25	0,3	3,85	3,0	1,5	1,5
4	1,4	0,4	1,3	x	2,35	x	2,4	1,75	2,0	1,7
5	0,9	x	0,85		2,0		1,0	1,0	2,0	2,0
6	0,5		0,85		1,2		0,5	0,5	0,86	2,6
7	x		0,5		0,45		0,45	x	0,65	3,35
8			0,4		x		x		0,5	1,7
9			x						0,3	1,7
10									x	1,65
11										1,25
12—14										1,3
15										1,0
16—17										0,8
18										0,5
19—21										0,3
22										

este mai scăzut, ajungînd la 5,5 la probele cu $(NH_4)_2SO_4$, deşi la acestea s-a adăugat $CaCO_3$ în plus faţă de cele 2 g adăugate iniţial.

Se mai observă că mărirea concentraţiei de aliment azotat are drept rezultat scăderea pH-ului.

PRODUŞII DE FERMENTAŢIE

Produşii principali : acizii butiric şi acetic (tabela 3).

Din datele expuse în tabela 3 se constată următoarele :

— Cantitatea cea mai mare de acid butiric se obţine la : triptofan — 0,1 g%, peptonă — 0,1 g%, alanină — 0,1 g% şi peptonă — 0,5 g%. La aceste probe, randamentul în acid butiric, calculat faţă de valoarea teoretică este cuprins între 101,3 şi 107%. Explicaţia acestui fapt este următoarea : valoarea teoretică pentru acidul butiric, ca şi pentru acidul acetic, s-a calculat pe baza ecuaţiei admise [8] :

$$4 \text{ glucoză} \rightarrow 3 \text{ butirat} + 2 \text{ acetat} + 8CO_2 + 10H_2$$

Rezultatele obţinute în ce priveşte cantitatea de acid butiric la probele cu peptonă, alanină şi triptofan ne îndreptăţesc să afirmăm că, în acest caz, fermentaţia decurge altfel decît după ecuaţia admisă.

$(NH_4)_2SO_4$ dă valori mai mici în ce priveşte cantitatea de acid butiric ; numai dacă i se adaugă peptonă, valorile cresc. Nici asparagina nu dă valori mari, în special în concentraţia de 0,5 g%. Concentraţii de aliment azotat mai mari de 0,1 g% nu favorizează creşterea cantităţii de acid butiric, ci dimpotrivă, duc, în majoritatea cazurilor, la scăderea ei.

— Cantitatea cea mai mică de acid acetic se obţine la : peptonă — 0,1 g%, alanină — 0,1 g%, $(NH_4)_2SO_4$ + peptonă — 0,1 g%, triptofan — 0,1 g% şi $(NH_4)_2$ + peptonă — 0,5 g%. Valori mari pentru acidul acetic se obţin la probele cu $(NH_4)_2SO_4$ şi asparagină. Creşterea concentraţiei de aliment azotat peste 0,1 g% determină, în majoritatea cazurilor, mărirea cantităţii de acid acetic.

— Ca urmare a celor arătate mai sus, valorile cele mai mari pentru raportul B/A se obţin la : peptonă 0,1 g% (12,7), alanină 0,1 g% (12,9), triptofan 0,1 g% (10,8), $(NH_4)_2SO_4$ + peptonă — 0,1 g% (10,35), $(NH_4)_2SO_4$ + peptonă — 0,5 g% (8,05). Se mai observă că o concentraţie de aliment azotat mai mare de 0,1 g % nu determină mărirea raportului B/A, ci dimpotrivă, scăderea lui. Excepţie fac probele cu $(NH_4)_2SO_4$, la care nu se observă diferenţe însemnate.

— Aciditatea totală cea mai mare se obţine la probele cu peptonă — 0,1 g% şi 0,5 g% alanină — 0,1 g%, triptofan — 0,1 g%, $(NH_4)_2SO_4$ + + peptonă — 0,5 g% şi asparagină — 0,1 g%. La aceste probe, aciditatea totală reprezintă 41—44% din glucoza fermentată, deci o valoare mai apropiată de cea teoretică (53%). Ca urmare a acestui fapt, la aceste probe, diferenţele între aciditatea calculată şi cea reală sînt mai mici în comparaţie cu celelalte probe. Concentraţiile de peptonă mai mari de 0,1 % au un efect favorabil asupra creşterii acidităţii totale. Nu acelaşi lucru se poate spune despre $(NH_4)_2SO_4$ şi asparagină. la care creşterea concentraţiei la 0,5 g% determină o scădere a acidităţii totale. Deşi, în general, probele care au un raport B/A mai mare au şi o aciditate totală mai mare, nu se poate spune că există o deplină concordanţă în acest

Tabela 3

Influența naturii și concentrației alimentului azotat asupra produșilor principali de fermentație (acid butiric și acid acetic)*

Variante în experiență	Acid butiric mg% ml mediu	Acid acetic mg% ml mediu	Aciditate totală mg% ml mediu	B/A	Aciditatea totală reprezintă % din glucoza fermentată	Diferența între aciditatea calculată teoretic și cea reală** mg% ml mediu	Randament acid butiric % (calculat față de valoarea teoretică)	Randament acid acetic % (calculat față de valoarea teoretică)
$(NH_4)_2SO_4$ — 0,1 %	905,0	283,8	1188,8	3,2	39,45	411,2	81,85	56,7
$(NH_4)_2SO_4$ — 0,5 %	873,7	240,5	1114,2	3,55	37,15	485,8	79,4	48,05
Peptonă — 0,1 %	1162,0	94,5	1256,5	12,7	41,85	343,4	105,6	18,85
Peptonă — 0,5 %	1114,3	205,5	1319,8	5,45	44,0	280,1	101,3	41,05
$(NH_4)_2SO_4$ + peptonă — 0,1 %	1033,1	99,8	1132,9	10,35	37,8	467,0	93,85	19,9
$(NH_4)_2SO_4$ + peptonă — 0,5 %	1088,2	134,7	1222,9	8,05	41,0	377,0	98,9	27,0
Asparagină — 0,1 %	969,5	277,5	1247,0	3,7	41,55	352,9	88,1	55,45
Asparagină — 0,5 %	775,6	306,6	1082,2	2,5	36,05	517,8	70,45	61,25
Alanină — 0,1 %	1139,4	96,5	1235,9	12,9	41,2	364,0	103,5	19,25
Triptofan — 0,1 %	1177,0	113,8	1290,8	10,8	43,0	309,1	107,0	22,7

Legenda : * Valorile reprezintă media rezultatelor a două probe paralele; B/A = acid butiric/acid acetic.
** Aciditate totală calculată teoretic = 1600 mg.

sens, deoarece proba cu aciditatea totală cea mai mare (peptonă — 0,5 g%) nu are şi raportul B/A cel mai mare [5], iar proba cu asparagină — 0,1 g%, care are o aciditate totală destul de bună, are în schimb un raport B/A mult mai scăzut [3], [7].

Produşii secundari neutri: acetonă, alcool butilic, alcool etilic (tabela 4).

Din datele expuse în tabela 4 se constată următoarele:

Tabela 4

Influenţa naturii şi concentraţiei alimentului azotat asupra produşilor secundari neutri de fermentaţie *

Variante în experienţă	Acetonă mg% ml mediu	Alcool butilic mg% ml mediu	Acool etilic mg% ml mediu	Alcooli totali mg% ml mediu
$(NH_4)_2SO_4$ — 0,1 %	2,32	34,2	17,2	51,4
$(NH_4)_2SO_4$ — 0,5 %	4,90	77,0	27,6	104,6
Peptonă — 0,1 %	1,33	6,0	21,9	27,9
Peptonă — 0,5 %	2,40	17,4	12,0	29,4
$(NH_4)_2SO_4$ peptonă — 0,1 %	1,40	6,5	9,8	16,3
$(NH_4)_2SO_4$ peptonă — 0,5 %	3,10	9,7	14,0	23,7
Asparagină —0,1 %	4,30	3,8	11,6	15,4
Asparagină — 0,5 %	3,70	20,7	21,4	42,1
Alanină — 0,1 %	1,40	6,1	13,8	19,9
Triptofan — 0,1 %	1,30	2,6	7,4	10,0

Legenda: * Valorile reprezintă media rezultatelor a două probe paralele.

— Acetona nu variază prea sensibil, dar se observă totuşi că valorile cele mai mici se obţin la probele cu triptofan — 0,1 g%, peptonă — 0,1 g%, $(NH_4)_2SO_4$ + peptonă — 0,1 g% şi alanină — 0,1 g%. Valorile cele mai mari se obţin la $(NH_4)_2SO_4$ — 0,5 g%, şi asparagină — 0,1 g% şi 0,5 g%. Cu excepţia probelor cu asparagină, la care nu se observă diferenţe însemnate, creşterea concentraţiei de aliment azotat are drept rezultat mărirea cantităţii de acetonă la dublu, la toate probele.

— Cantitatea cea mai mică de alcooli totali se obţine la probele cu triptofan, alanină, peptonă, singură sau în amestec cu $(NH_4)_2SO_4$, asparagină — 0,1 g%.

Cele mai mari valori se obţin la $(NH_4)_2SO_4$ — 0,1 g% şi 0,5 g% şi la asparagină — 0,5 g%. Creşterea concentraţiei de aliment azotat are ca rezultat creşterea cantităţii de alcooli totali la dublu, în special pentru probele cu $(NH_4)_2SO_4$ şi asparagină. Sporeşte în aceste condiţii alcoolul butilic şi mai puţin cel etilic.

Toate constatările de mai sus pledează pentru o influenţă netă a alimentului azotat asupra formării diverşilor produşi de fermentaţie. Fără

îndoială că alimentul azotat nu intervine direct în mecanismul fermentației; fiind însă alimentul constructiv al bacteriilor, el contribuie desigur la buna dezvoltare a lor, respectiv a echipamentului enzimatic corespunzător. În cazul de față, se observă că pentru obținerea unei cantități mari de acid butiric (în raport cu acidul acetic) și a unor cantități minime de produși neutri, cele mai potrivite alimente azotate sînt peptona, alanina, triptofanul, concentrația optimă fiind de 0,1 g%. Fără îndoială că și alți aminoacizi ar putea avea influențe favorabile în acest sens. Rezultate destul de bune se obțin și în cazul folosirii unui amestec de $(NH_4)_2SO_4$ și peptonă, în concentrație de 0,1 g% și 0,5 g%. Se mai observă că azotul organic ridică valoarea pH-ului care, la aceste probe, la sfîrșitul fermentației, este 7 sau în jur de 7; există o relație între valoarea pH-ului și produșii de fermentație, în sensul că la probele care la sfîrșit au un pH = 7, raportul B/A este în general mai mare, aciditatea totală este și ea mai mare, iar produșii neutri sînt în cantitate mai mică.

CONCLUZII

1. Din punctul de vedere al unei dezvoltări morfologice normale peptona și $(NH_4)_2SO_4$ sînt sursele de azot cele mai indicate. Pentru sporulare, concentrațiile de 0,5 g% sînt mai favorabile.

2. Maximul de fermentație se situează, la majoritatea probelor, la 48 h de la însămînțare.

3. Alanina și mai ales triptofanul măresc mult durata de fermentare (10 zile la alanină și 22 de zile la triptofan) și întîrzie apariția maximului de fermentație.

4. Creșterea concentrației de aliment azotat determină scurtarea duratei de fermentație, care la probele cu peptonă ajunge la jumătate. În acest caz, maximul de fermentație se situează la 24 h de la însămînțare, apare brusc și are o valoare foarte mare.

5. Peptona, alanina și triptofanul, în concentrație de 0,1 g%, determină creșterea cantității de acid butiric, scăderea cantității de acid acetic și de produși secundari neutri. Rezultatele apropiate în același sens se obțin și cu $(NH_4)_2SO_4$ + peptonă, în concentrație de 0,1 g%.

6. Creșterea concentrației de aliment azotat peste valoarea de 0,1 g% determină scăderea pH-ului și a cantității de acid butiric, creșterea cantității de acid acetic și de produși neutri.

7. Aciditatea totală are valori mai apropiate de valoarea teoretică la probele de peptonă, alanină și triptofan.

8. Probele care la sfîrșitul fermentației au un pH = 7, au în general un raport B/A mai mare, aciditatea totală mare și cantitatea de produși secundari mai mică.

Prezentată la redacție la 13 noiembrie 1967

Catedra de fiziologia plantelor și microbiologie,
Facultatea de biologie, Universitatea București

BIBLIOGRAFIE

1. Azova L. G., *O voznojnosti kultivirovania Clostridium butyricum na sinteticeskih sredah*, Dokladi Akademii Nauk SSSR **156**, *3*, 689–691 (1964).
2. Belozerski A. N., Proskuriakov N. I., *Prakticeskoe rukovadstvo po biohimii rastenii*, Gosudarstvennoe izdatelstvo „Sovestkaia nauka", Moscova, 1951, p. 306.
3. Bergère J. L., Hermier J., *Étude des facteurs contrôlant la croissance et la sporulation de Clostridium butyricum*, Annales de l'Institut Pasteur **109**, *1*, 80–89 (1965).
4. Bernhauer K., *Gärungschemisches Praktikum*, Verlag von Julius Springer, Berlin, 1936, 130–140, 154–156.
5. Bertrand G., Thomas P., *Guide pour les manipulations de chimie biologique*, H. Dunod et E. Pinat, Editeurs, Deuxième édition, Paris, 1913.
6. Emțev V. I., *O sporoobrazovanii u Clostridium pasteurianum*, Mikrobiologhia, **32**, *3*, 434–438 (1963).
7. Heer F., Bachofen R., *Pyruvatstoffwechsel von Clostridium butyricum*, Archiv für Mikrobiologie, **54**, *1*, 1–13 (1966).
8. Rainbow C., Rose A. H. — *Biochemistry of industrial microorganisms*, Academic Press, London – New York, 1963, 407.
9. Vinogradski S. N., *Mikrobiologhia pocivî*, Izdatelstvo Akademii Nauk SSSR, Moscova, 1952, 368–374.
10. Virtanen A. I., Pulki L., *The volatility with steam of watersoluble organic substances*, J. amer. chem. soc., **50**, *12*, 3138 (1928).
11. Voicu I., *Un procedeu pentru a obține din sol un material sporulat de bacterii butirice*, Comunicările Academiei R.S.R., **12**, *12*, 1327–1332 (1966).
12. Voicu I., *O metodă de cercetare a microorganismelor și a enzimelor, prin punerea lor în contact intim cu substratul, într-un mediu solidificat cu ghips*. Analele Universității București.

INFLUENCE OF NATURE AND CONCENTRATION OF THE NITROGENOUS NUTRIENT ON THE BUTYRIC FERMENTATION PROCESS

SUMMARY

The influence of nature and concentration of the nitrogenous nutrient on the bacterial cells morphology, fermentation process course and final products was followed. Ammonium sulfate, peptone, ammonium sulfate+peptone, asparagine, each in two concentrations (0.1 and 0.5 g%), and also, alanine and tryptophane, each in a concentration of 0.1 g% were used. These amounts correspond to 0.0212 g N and 0.106 g N for the variants with 0.1 g% and 0.5 g% nitrogenous substance, respectively.

It has been stated that ammonium sulfate and peptone in a concentration of 0.5 g% ensures most satisfactoily the normal bacterial cells development and sporulation at the end of the fermentation process.

As far as fermentation products are concerned, the most adequate nitrogenous sources are the peptone, alanine and tryptophane in a concentration of 0.1 g%, which determines the increase of the butyric acid, decrease of acetic acid and secondary neutral products quantities.

Also, good results are obtained with ammonium sulfate + peptone in a concentration of 0.1 g%. The increase of the nitrogenous nutrient proportion over 0.1 g% is not indicated, because it determines the decrease of butyric acid, increase of acetic acid and secondary neutral products quantities.

ST. CERC. BIOCHIM. 11, 3, 305–311 (1968)

EXOSMOZA SUBSTANȚELOR REDUCĂTOARE DIN MUȘCHIUL GASTROCNEMIAN DE BROASCĂ ÎN DIFERITE CONDIȚII EXPERIMENTALE

LORA SCOLNIC

Rezumat. — Stări funcționale similare ca : denervarea, curarizarea, narcoza, mișcarea pasivă pe de o parte, excitarea și distrugerea măduvei spinării pe de altă parte, produc scăderea, respectiv creșterea puterii reducătoare a substanțelor exosmozate din mușchiul gastrocnemian de broască.

Scăderea excitabilității obținută prin curarizare, nu modifică cantitatea substanțelor reducătoare difuzată în soluția salină înconjurătoare sub acțiunea unui curent electric față de mușchiul normal excitat în condiții identice.

Într-o lucrare anterioară [1] am arătat că atît înlăturarea controlului sistemului nervos central asupra funcției musculare, prin denervare și sacrificare imediată, cît și stimularea mușchiului gastrocnemian de broască, produsă de un curent electric, au ca efect o intensificare a metabolismului glucidic, manifestată prin creșterea substanțelor reducătoare exosmozate într-o soluție salină înconjurătoare.

Lucrarea de față are scopul de a completa unele date expuse în lucrarea anterioară în ceea ce privește denervarea și de a urmări dacă scoaterea mușchiului de sub controlul nervos, prin curarizare, narcoză, respectiv mișcare pasivă, are aceleași repercusiuni asupra difuziei substanțelor reducătoare ca și cele produse de denervare, deoarece este cunoscut faptul că „în stări funcționale similare se influențează probabil, în același sens, aceleași sisteme biochimice musculare" [2].

Pe de altă parte, ținînd seama că excitația electrică a mușchiului produce o intensificare a metabolismului glucidic, tradusă prin creșterea substanțelor reducătoare exosmozate [1], ar fi de așteptat ca și distrugerea măduvei spinării, care „ca efect se aseamănă cu un tetanos puternic și prelungit" [2], să ducă la aceleași modificări.

Lucrarea mai urmărește comportarea unui mușchi cu excitabilitate modificată prin curarizare, supus excitației electrice, față de mușchiul normal care primește aceeași excitație.

Menționăm că literatura studiată nu cuprinde lucrări în care să se fi urmărit exosmoza substanțelor reducătoare din mușchi în general, sau efectul produs asupra acestei exosmoze de curarizare, narcoză, mișcare pasivă, respectiv distrugerea măduvei spinării în special.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele au fost efectuate pe muşchiul gastrocnemian de broască (*Rana ridibunda*), la temperatura laboratorului. S-a lucrat pe loturi de cîte 10 broaşte normale, denervate, curarizate, narcotizate, executînd mişcare pasivă, cu măduva spinării distrusă sau supuse excitării după o prealabilă curarizare. Denervarea s-a realizat prin secţionarea nervului sciatic de la unul din picioarele posterioare, celălalt servind drept control, cu sacrificarea după 2 ore. Curarizarea s-a obţinut injectînd în sacul dorsal al broaştei 1 ml flaxedil 2 ‰, cu sacrificarea după 20 minute, cînd relaxarea era profundă.

Influenţa curarizării, respectiv narcozei, s-a urmărit atît pe loturi cît şi pe acelaşi animale. În acest scop am recurs la procedeul — folosit şi în altă lucrare [3] — de legare cu nod dublu a unuia din picioarele posterioare, deasupra muşchiului gastrocnemian; se împiedică astfel pătrunderea flaxediului şi novocainei în piciorul legat. Pentru narcoză, s-a injectat în sacul dorsal 1 ml clorhidrat de novocainã 0,5 %. Sacrificarea animalului a avut loc la 15, respectiv 60 de minute de la injectare, cînd fenomenul de relaxare era total.

Mişcarea pasivă s-a executat timp de 15 minute la unul din picioarele posterioare, în condiţiile stabilite de E. Macovschi şi C. Iordache [2], celălalt servind drept control.

Distrugerea măduvei spinării s-a făcut în modul obişnuit.

Excitarea s-a obţinut legîndu-se la extremităţile muşchiului electrozi de argint cloruraţi, aflaţi în legătură cu un generator de impulsuri. Durata excitaţiei a fost de 3 minute, intensitatea de 2,2 mA, frecvenţa 120 imp/min, durata unei excitaţii 5 msec.

În cazul tuturor variantelor, după aplicarea tratamentului, picioarele posterioare au fost tăiate simultan, iar muşchii, prelevaţi în cel mai scurt timp posibil, au fost introduşi în 7 ml soluţie Ringer Jendrassik [4], conţinînd la litru: 6,5 g clorură de sodiu, 0,2 g clorură de potasiu, 0,2 g clorură de calciu şi 0,1 g bicarbonat de sodiu. La temperatura laboratorului (20 ± 2°C), sub aerare continuă, după 2 ore, se dozau în 2,5 ml extract substanţele reducătoare cu ajutorul metodei Hagedorn-Jensen [5], rezultatele exprimîndu-se în ml tiosulfat de sodiu N/200.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În lucrarea anterioară [1] am pus în evidenţă faptul că valorile privind puterea reducătoare a substanţelor exosmozate din muşchii simetrici ai broaştei normale sînt concordante. Aceeaşi concordanţă am obţinut-o şi în cazul muşchilor curarizaţi (tabela 1), ceea ce a permis să se urmă-

Tabela 1

Capacitatea de reducere a substanţelor exosmozate într-o soluţie salină din muşchiul gastrocnemian de broască curarizat cu flaxedil exprimată în ml tiosulfat de sodiu N/200 întrebuinţaţi

Muşchi stîng = S
Muşchi drept = D

	S	D
	0,24	0,27
	0,60	0,63
	0,56	0,53
	0,55	0,56
	0,17	0,16
	0,32	0,30
Media	0,41	0,41

rească, pe același animal, influența exercitată de curarizare asupra metabolismului glucidic al unui mușchi supus excitației electrice, determinîndu-se substanțele reducătoare exosmozate în comparație cu mușchiul normal, excitat identic.

Dat fiind că în experiențele anterior publicate [1], de urmărire a influenței denervării asupra difuziei substanțelor reducătoare, sacrificarea animalului s-a făcut imediat sau după 24 de ore de la denervare, exosmoza reflectînd un efect similar cu cel provocat de o excitație, respectiv comportare identică cu martorul, am găsit necesar — în scopul de a surprinde eventuale modificări — să completăm datele expuse în lucrarea precedentă, cu determinări la care sacrificarea animalului să se facă și la un interval mai scurt.

Analiza rezultatelor cuprinse în tabela 2, arată că scoaterea mușchiului de sub controlul nervos, prin denervare și sacrificare la 2 ore, are

Tabela 2

Capacitatea de reducere a substanțelor reducătoare exosmozate într-o soluție salină din mușchiul gastrocnemian de broască denervată și sacrificată după 2 ore, exprimată în ml tiosulfat de sodiu N/200 întrebuințați.

Mușchi denervat = D
Mușchi normal = M

D	M
0,27	0,67
0,26	0,45
0,34	0,55
0,43	0,49
0,25	0,42
0,15	0,28
Media 0,28	0,47

ca efect o scădere a substanțelor reducătoare difuzate în soluția salină înconjurătoare. Rezultatele noastre concordă cu cele obținute de Martinek și Mikules [6], după care denervarea produce creșterea semnificativă a glicogenului la mușchii de șobolan. Scăderea puterii reducătoare s-ar datora și în cazul nostru scăderii proceselor glicolitice.

Înainte de a trece la urmărirea pe același animal a influenței curarizării și narcozei, am efectuat cîteva determinări pentru a verifica dacă legarea însăși nu modifică viteza exosmozei substanțelor reducătoare. Din tabela 3, coloana A, se observă că puterea reducătoare a substanțelor difuzate din mușchiul piciorului liber este mai mare decît la piciorul legat. Acesta se datorește faptului că în timpul experimentării piciorul liber nefiind perfect imobilizat, se putea contracta. Din același tabel, coloana B, se constată că în cazul cînd piciorul liber este perfect imobilizat există o concordanță satisfăcătoare între cei doi mușchi simetrici. Era necesar deci să imobilizăm perfect piciorul liber, pentru ca acțiunea exer-

citată de aplicarea tratamentului să nu fie mascată de efectul produs de mișcarea piciorului liber (tabela 3, coloana A).

Tabela 3

Capacitatea de reducere a substanțelor exosmozate într-o soluție salină din mușchiul gastrocnemian de broască, exprimată în ml tiosulfat de sodiu N/200 întrebuințați. Un picior este legat, – celălalt liber.

Mușchi stîng = S
(Picior legat)
Mușchi drept = D
(martor)

A = picior liber neimobilizat
B = picior liber imobilizat

A		B	
S	D	S	D
0,18	0,24	0,19	0,20
0,42	0,62	0,62	0,62
0,38	0,48	0,26	0,29
0,68	0,86	0,24	0,22
0,16	0,28	0,17	0,20
0,28	0,37	0,29	0,21
Media 0,35	0,47	0,29	0,29

După cum rezultă din tabela 4, curarizarea urmărită atît pe loturi cît și pe același animal produce o scădere a substanțelor reducătoare exosmozate. Datele noastre corespund cu cele obținute de Gombara și colab.

Tabela 4

Capacitatea de reducere a substanțelor exosmozate într-o soluție salină din mușchiul gastrocnemian de broască normală și curarizată cu flaxedil, exprimată în ml tiosulfat de sodiu N/200 întrebuințați.

Mușchi normal = M
Mușchi curarizat = C
A = experiențe efectuate pe loturi.
B = experiențe efectuate pe aceeași broască. Un mușchi este sub acțiunea flaxedilului, mușchiul simetric provenit de la piciorul legat, normal

A		B	
C	M	C	M
0,10	0,15	0,52	0,60
0,47	0,60	0,10	0,20
0,23	0,31	0,33	0,46
0,22	0,36	0,25	0,40
0,50	0,61	0,23	0,30
0,16	0,20	0,18	0,27
Media 0,28	0,37	0,27	0,37

[7], precum și de Fainșmidt și colab. [8], după care în curarizare sînt inhibate procesele producătoare de energie, prin blocarea degradării glicogenului.

Și în cazul narcozei, respectiv al mișcării pasive (tabelele 5 și 6) s-au înregistrat valori scăzute ale substanțelor reducătoare difuzate, față de martor. Menționăm că, Turpikova și colab. [9] nu obțin în urma narcozei modificări în conținutul mușchiului în glucoză, în ciuda faptului că viteza de absorbție a mușchiului pentru glucoza sanguină crește.

Tabela 5

Capacitatea de reducere a substanțelor exosmozate din mușchiul gastrocnemian de broască normal și narcotizat cu novocaină, exprimată în ml tiosulfat de sodiu N/200 întrebuințați.
Mușchi narcotizat = N
Mușchi normal = M

A = experiențe efectuate pe loturi.
B = experiențe efectuate pe același animal. Un mușchi este sub acțiunea novocainei, mușchiul simetric normal.

	A		B	
	N	M	N	M
	0,17	0,37	0,63	0,86
	0,19	0,30	0,22	0,36
	0,23	0,30	0,18	0,23
	0,20	0,28	0,30	0,38
	0,35	0,47	0,40	0,52
Media	0,22	0,34	0,34	0,47

Tabela 6

Capacitatea de reducere a substanțelor exosmozate într-o soluție salină din mușchiul gastrocnemian de broască, exprimată în ml tiosulfat de sodiu N/200 întrebuințați. Un mușchi este supus 15 minute mișcării pasive, mușchiul simetric în repaus.
Mușchi supus mișcării pasive = P
Mușchi în repaus = R

	P	R
	0,51	0,63
	0,19	0,23
	0,55	0,65
	0,22	0,26
	0,44	0,59
	0,30	0,38
Media	0,37	0,45

În experiențele legate de al doilea obiectiv al lucrării de față, și anume compararea efectului produs de distrugerea măduvei spinării cu acela al unui tetanos, prelevările de mușchi au fost efectuate imediat după distrugerea măduvei spinării. Rezultatele obținute (tabela 7) au confirmat presupunerile noastre : ca și în cazul aplicării unei excitații electrice [1], substanțele reducătoare difuzate din mușchiul gastrocnemian de broască cu măduva spinării distrusă sînt crescute. Excitarea electrică aplicată mușchiului de broască curarizată produce creșterea puterii reducătoare a substanțelor difuzate. Din tabela 8 rezultă că raportul R între intensitatea exosmozei substanțelor reducătoare din mușchiul curarizat excitat, față de aceea din mușchiul curarizat neexcitat, a variat — ca și în cazul mușchiului normal, excitat în mod identic [1], — între limite destul de largi de la 1,42 la 2,60, ceea ce nu ne permite să conchidem că scăderea excitabilității produsă de curarizare influențează exosmoza substanțelor reducătoare din mușchi sub acțiunea unui curent electric.

Tabela 7

Capacitatea de reducere a substanţelor exosmozate într-o soluţie salină din muşchiul gastrocnemian de broască cu măduva spinării distrusă şi sacrificată imediat, exprimată în ml tiosulfat de sodiu N/200 întrebuinţaţi.

Broască cu măduva spinării distrusă = S
Broască normală = M

S	M
0,30	0,19
0,33	0,17
0,28	0,26
0,42	0,19
0,32	0,30
0,51	0,25
0,67	0,40
0,67	0,50
Media 0,44	0,28

Tabela 8

Capacitatea de reducere a substanţelor exosmozate într-o soluţie salină din muşchiul gastrocnemian de broască curarizat şi excitat (3 minute 2,2, mA, 120 imp/min, durata 5 msec) exprimată în ml tiosulfat de sodiu N/200 întrebuinţaţi.

Muşchi curarizat excitat = C.E
Muşchi curarizat = C

$$R = \frac{C.E}{C}$$

C,E	C	R
0,60	0,42	1,42
0,35	0,24	1,45
0,63	0,38	1,65
0,34	0,22	1,54
0,43	0,19	2,26
0,39	0,15	2,60
0,25	0,14	1,78
0,27	0,17	1,60
Media 0,41	0,24	1,77

CONCLUZII

1. Stări funcţionale similare, ca : denervarea, curarizarea, narcoza, mişcarea pasivă pe de o parte, excitarea şi distrugerea măduvei spinării pe de altă parte produc scăderea, respectiv creşterea substanţelor reducătoare exosmozate din muşchiul gastrocnemian de broască.

2. Scăderea excitabilităţii obţinută prin curarizare nu modifică cantitatea substanţelor reducătoare difuzată în soluţia salină înconjurătoare, sub acţiunea unui curent electric, faţă de muşchiul normal excitat în condiţii identice.

Mulţumim tov. Benţia Traian pentru asistenţa tehnică acordată.

Prezentat la redacţie la 8 martie 1968

Institutul de biochimie
al
Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. L. Scolnic, *Exosmoza substanțelor reducătoare din mușchiul gastrocnemian de broască în diferite stări funcționale*, St. cerc. biochimie, 9, 9 (1966).
2. E. Macovschi, C. Iordache, *Nivelul fosfagenului în diferite stări funcționale ale mușchiului*, St. cerc. biochim. 4, 207 (1962).
3. Tr. Rădulescu, D. Cotariu, L. Scolnic, *Fosforul anorganic și exosmoza lui din mușchi în diferite stări de excitabilitate și efort*, St. cerc. biochim., 7, 97 (1964).
4. L. Jendrassik, I. Faiszt, *Die ersten chemischen Prozesse der Muskelkontraktion*, Ann. Sci. Budapest Rolando Eötvös, nom Sect. Biol. 1, 133 (1957).
5. I. Manta, A. Ciplea, *Metodele laboratorului clinic*, ed. II, București, 122 (1947).
6. I. Martinek, I. Mikulas, *Changes in glycogen contents of muscles after denervation in early post-natal life in rats*, Physiol. Bohemoslov 3, 53 (1954).
7. G. C. Gombara, L. Adezati, *Curare and intermediate metab.*, Arch. „E. Maragliano" patol. e clin. 8, 1001 (1953).
8. I. Fainsmidt, M. T. Dmitrenko, *Ovbianii kurare na himiceskie proțesî pri misecinoi deiatelnosti*, Biul. experim. biol. mediț. 7, 6 (1939).
9. Z. N. Turpikova-Kazimirova, L. M. Vdovichenko, T. P. Saltykova, *Carbohidrate metabolism during narcotic sleep and during the period of awakening*, N2rv. Sistema Sbornic, 1, 33— (1960).

DIFFUSION OF REDUCTIVE SUBSTANCES OF THE FROG GASTROCNEMIUS MUSCLE UNDER DIFFERENT EXPERIMENTAL CONDITIONS

SUMMARY

Similar functional states such as denervation, curarization, anaesthesia, passive movement on the one hand, and stimulation and back bone marrow's destroying on the other hand, induce the diminution, respectively the increase of the reductive power of substances diffused from the frog gastrocnemius muscle.

The decrease of excitability obtained by curarization does not change the amount of reductive substances diffused in the surrounding saline solution under the action of an electrical current as compared to the control muscle stimulated under identical conditions.

ST. CERC. BIOCHIM. 13, 3, p. 313 – 320 (1968)

ELECTROFOREZA PROTEINELOR SARCOPLASMATICE MUSCULARE ÎN GEL DE POLIACRILAMIDĂ

DINU TĂNĂSESCU şi NATALIA MOLDOVEANU

Rezumat. — Prin electroforeză în gel de poliacrilamidă în strat subţire, verticală, au fost fracţionate un număr între 17 şi 22 proteine sarcoplasmatice, în funcţie de condiţiile utilizate.

Gradul de separare, repartizarea fracţiunilor, precum şi claritatea imaginii electroforetice depind de o serie numeroasă de factori, dintre care în nota de faţă au fost analizaţi patru şi anume : natura tamponului, pH-ului, concentraţia gelului de poliacrilamidă şi concentraţia şi volumul proteinei analizate.

În funcţie de aceşti patru factori luaţi în consideraţie, au fost constatate diferenţe în ceea ce priveşte repartizarea, numărul şi claritatea principalelor fracţiuni proteice. Astfel în timp ce prin separarea în tamponul TRIS-EDTA-borat la pH 7,15 sau 8,4 atît la o concentraţie a gelului de 5% cît şi de 7% apar două fracţiuni anodice principale, în tampon glicocol, pH 8,4 la ambele concentraţii, nu apare decît o singură fracţiune.

În funcţie de concentraţia gelului diferă numărul fracţiunilor principale anodice, care sînt mai numeroase şi mai net separate în gelurile cu o concentraţie de 5%, ceea ce denotă că acestea sînt proteine cu greutăţi moleculare ridicate.

În cazul gelurilor cu o concentraţie de 7% s-a constatat că aplicînd probe într-un volum mai mare de 0,04 ml (1,2 mg proteină) serie de fracţiuni proteice anodice se estompează, uneori chiar dispărînd complet.

Electroforeza în poliacrilamidă s-a impus în ultimii ani ca una din cele mai eficiente tehnici de separare a proteinelor. Marea ei capacitate de rezoluţie se datoreşte în primul rînd combinării efectului electroforetic cu acela de filtrare moleculară, care, semnalat pentru prima dată la gelul de amidon [1], [2], prezintă în cazul gelului de poliacrilamidă un efect maxim. Pe lîngă această caracteristică, gelul de poliacrilamidă mai posedă o serie de calităţi ca : termostabilitate, transparenţă perfectă, calităţi mecanice ridicate, relativă inerţie chimică, este neionic, ceea ce face să se elimine curentul de electroendosmoză care ridică unele dificultăţi în cazul gelului de agar şi amidon. Mai trebuie relevat şi faptul că prin modificarea raporturilor dintre acrilamidă şi bisacrilamidă se pot obţine geluri cu porozitate variabilă între limite largi, ceea ce face ca gelul de poliacrilamidă să poată fi folosit la separarea tuturor tipurilor de proteine, indiferent de greutatea lor moleculară.

Am aplicat această tehnică la separarea şi caracterizarea proteinelor solubile musculare, care în ultimii ani au format unul dintre subiectele noastre de cercetare [3], [4], [5.].

Dintre numeroasele variante existente ale eclectroforezei în gel de poliacrilamidă — disc electroforeză [6], [7], electroforeză orizontală [8], combinarea gelului de poliacrilamidă cu cel de agaroză [9], electroforeză în tub [10] etc. ne-am oprit la o tehnică de electroforeză în strat subțire, verticală, descrisă recent de Akroyd [11]. Motivele care ne-au determinat la această alegere au fost, printre altele, următoarele : este o tehnică ușor de aplicat, cu care pot fi separate și probe diluate, este de o mare reproductibilitate, dă posibilitatea unei aprecieri comparative simultane a cel puțin șase probe și poate fi aplicată cu deosebit succes la localizarea enzimelor.

În lucrarea de față, am urmărit separarea proteinelor în două tampoane diferite, la diferite pH-uri și la o concentrație de poliacrilamidă de 5 și 7%, insistînd în același timp asupra detaliilor de metodică, cu toate modificările aduse de noi, deoarece, date fiind calitățile superioare ale acestei tehnici, o recomandăm tuturor care cercetează metabolismul proteic.

MATERIAL ȘI METODE

Extracția proteinelor sarcoplasmatice. S-a lucrat pe mușchi gastrocnemieni de șobolani, rasa Wistar, care imediat după decapitarea animalului au fost înghețați în azot lichid și apoi omogenizați cu ajutorul unui omogenizator Potter din sticlă, în raportul mușchi/extractant 1/3. Ca extractant s-a utilizat o soluție formată din zaharoză 0,3 M, EDTA-Na_2 3 mM în tampon TRIS-HCl 0,04 M, pH 7,5 [12]. În lipsa azotului lichid, mușchiul se mărunțește fin și apoi se omogenizează. Rezultatele obținute în cele două variante sînt identice. Omogenatul se lasă o oră la 4°C și apoi se centrifughează la 0°C timp de 15 minute, succesiv la 4 000 și 13 000 t/min.

Electroforeza și descrierea dispozitivului de migrare. Electroforeza în poliacrilamidă s-a efectuat conform tehnicii descrisă de Akroyd [11], adaptată condițiilor noastre de laborator.

Polimerizarea s-a făcut într-un dispozitiv de migrare (fig. 1, A) format din două plăci de sticlă (fig. 1, B, a, b) de 15 cm lungime, 8,5 cm lățime și 0,2 cm grosime. Pe una din plăci (fig. 1 B, b) se lipesc la extremități două bucăți de sticlă (c) de 7,5 cm înălțime, 1 cm lățime și 0,2 cm grosime. Se suprapun perfect cele două plăci și se lipesc fîșii de leucoplast pe părțile lor laterale, iar cu o fîșie mai lungă, care ulterior se va scoate, se lipește una din părțile deschise. Pentru a asigura o mai bună etanșeitate, se mai prind părțile laterale, peste leucoplast, cu 3—4 cleme din material plastic cu arcul puternic. Pentru a verifica etanșeitatea dispozitivului, se introduce apă prin partea care a rămas deschisă : nivelul trebuie să rămînă constant. Între plăcile de sticlă așezate vertical, se toarnă cu grijă, pînă la 1 cm de marginea superioară, soluția filtrată de acrilamidă și bisacrilamidă, căreia i s-a adăugat imediat înainte persulfat de amoniu drept catalizator. Descrierea exactă a tuturor tampoanelor, precum și modul exact în care s-a preparat gelul va fi făcută ulterior. După aproximativ 10 minute, timp în care soluția s-a gelificat suficient, ceea ce se constată prin aspectul opalescent al soluției, se introduce apă distilată, cu ajutorul unei pipete Pasteur, pînă se formează un strat de aproximativ 5—7 mm. După alte 10 minute, în care gelificarea se desăvîrșește, se îndepărtează stratul de apă, iar partea superioară a gelului se spală în mai multe reprize pentru îndepărtarea urmelor de substanțe care nu au gelificat. Se acoperă gelul cu apă pînă la marginea superioară a dispozitivului și se introduc cu grijă un număr de 7 separatoare. Aceste separatoare vor face un număr de 6 compartimente în care se vor introduce probele (fig. 1, A). Separatoarele sînt formate din bucăți de tub de material plastic de 6—8 mm înălțime, cu diametrul interior de 3 mm și grosimea pereților de 0,5 mm. Este de dorit ca separatoarele să nu aibă

un diametru mai mare de 3 mm, deoarece altfel vor presa asupra celor două plăci de sticlă, ceea ce va face ca apa să se infiltreze între gel şi acestea. Pentru a se evita o eventuală interferenţă a probelor, este de dorit să se pună unul lîngă altul două din aceste tuburi, de aceeaşi mărime şi să se implînte ferm în gel.

Odată terminate aceste operaţii, se va scoate leucoplastul care închide latura inferioară, se va introduce vertical dispozitivul într-o cuvă de electrofozeză, pe două mici suporturi de sticlă sau plexiglas, astfel ca gelul să fie la 2—5 mm de fundul cuvei.

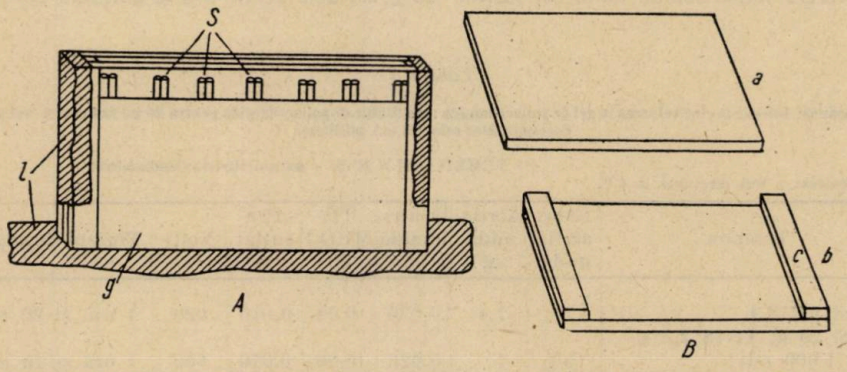


Fig. 1. — Schema dispozitivului de migrare. A — imaginea acestuia dispusă vertical: s = separatoarele; l = leucoplast, g = gelul. B = părţile componente ale dispozitivului de migrare: a = capacul de sticlă; b = placa de sticlă căreia i s-au lipit cele două bucăţi de sticlă laterale (c).

Trebuie avut grijă ca întreaga parte interioară a gelului să se afle în contact direct cu tamponul din cuvă.

Cea de-a doua cuvă de electroforeză se va aşeza la înălţimea părţii superioare a dispozitivului de migrare. Cuvele de electroforeză au o lungime de 22 cm, o lăţime de 8 cm, o înălţime de 4 cm şi sînt împărţite în 3 compartimente egale, care comunică între ele datorită unor orificii. În ultimul compartiment sînt puşi electrozii de platină, dispuşi pe întreaga lungime a cuvelor.

Introducerea probelor în dispozitivul de migrare se face în modul următor: se va pipeta prin apă, între separatoare, 0,01—0,1 ml, în funcţie de concentraţia soluţiei proteice.

Probele (0,3—3 ml proteină) au fost diluate în prealabil cu o soluţie de zaharoză 50% în raportul soluţie proteică/zaharoză 4 : 1, pentru ca prin diferenţa de densitate soluţia proteică să se depună pe suprafaţa gelului, între spaţiile delimitate de separatoare. Legătura între cea de-a doua cuvă de electroforeză şi dispozitivul de migrare se face prin intermediul a două fâşii de hîrtie Whatman 3 MM, de lăţimea gelului şi care se acoperă cu o fîşie de material plastic de aceiaşi mărime, pentru a se evita evaporarea. Pentru o migrare corectă este necesar să se elimine orice bulă de aer şi să existe o perfectă orizontalitate atît a cuvei de electroforeză, cît şi, implicit, a dispozitivului de migrare. Se aplică o tensiune de curent de 25 mA şi se lasă aproximativ 15 min. Viteza de migrare a proteinelor a fost urmărită în toate cazurile, prin marcarea a cel puţin unei probe, cu albastru de bromfenol dizolvat în zaharoză 50%.

În momentul în care banda colorată a proteinelor marcate cu albastru de bromofenol a migrat în gel aproximativ 1 cm, se opreşte curentul, se scot separatoarele, se înlocuieşte apa cu tamponul de migrare şi se introduc hîrtiile de legătură care se implîntă pînă la suprafaţa gelului. Se aplică din nou o tensiune de curent de 25 mA şi se lasă la migrare. După ce banda colorată a ajuns în partea inferioară a dispozitivului, se mai lasă încă o durată

de timp (în tabela 1 este dată durata de timp totală a electroforezei) dependentă de pH, de tamponul utilizat şi de natura proteinei analizate. Pentru a se evita încălzirea gelului, electroforeza s-a efectuat la 4°C.

Colorarea proteinelor. După electroforeză se desfac cele două plăci, iar cea de care gelul este prins, se introduce 30 minute într-o soluţie de amidoschwarz 0,5% în acid acetic 5%. Se îndepărtează excesul de colorant prin spălare într-un curent de apă de robinet şi apoi se introduce într-o baie de acid acetic 5%. O decolorare mai rapidă se poate realiza prin electroforeza într-o soluţie de alcool metilic 20%, cu acid acetic 5% şi glicerină 2,5% [9].

Tabela 1

Tampoanele folosite la electroforeza în gel de poliacrilamidă : cantităţile de poliacrilamidă pentru 20 ml tampon şi voltajul corespunzător celor 25 mA utilizaţi

(*) TEMED = N.N.N'.N' - tetramethylethylendiamină;
Electroforeza a fost efectuată la 4°C.

Tampon	Conc. acrilamidă	Acrilamidă g	Bisacrilamidă g	TEMED * ml	Persulfat g	Volţi	Timpul de migrare
Glicocol pH 8,4 (glicocol 25 g, TRIS 2,3 g apă la 1 000 ml)	7%	1,4	0,036	0,06	0,010	620	1 oră şi 20 min
	5%	1	0,026	0,06	0,010	650	1 oră şi 10 min
TRIS-EDTA-borat pH 7,15 (TRIS 10,8 g Acid boric 27 g apă la 1 000 ml)	7%	1,33	0,070	0,06	0,010	350	3 ore
	5%	0,95	0,050	0,06	0,010	350	2 ore şi 25 min
TRIS-EDTA-borat pH 8,4 (TRIS 10,8 g EDTA 0,93 g Acid boric 5,5 g apă la 1 000 ml)	7%	1,33	0,070	0,06	0,010	350	2 ore şi 35 min
	5%	0,95	0,050	0,06	0,010	350	2 ore şi 15 min

Tampoanele utilizate şi prepararea gelului de poliacrilamidă. Electroforeza şi prepararea gelului s-au efectuat în trei tampoane diferite şi la două concentraţii de poliacrilamidă. Reţeta tampoanelor cu proporţiile substanţelor, timpul de migrare şi voltajul care se obţine la 25 mA sînt date în tabela 1. În cursul tuturor variantelor utilizate s-a procedat în felul următor : se cîntăresc cantităţile corespunzătoare de acrilamidă şi bisacrilamidă, calculate pentru 20 ml tampon, necesari pentru umplerea unui dispozitiv de migrare. Se dizolvă în 19 ml din tamponul respectiv, se filtrează şi se adaogă TEMED-ul. Se dizolvă persulfatul de amoniu într-un ml tampon şi se adaugă imediat celor 19 ml. Se amestecă şi se toarnă soluţia în dispozitivul de migrare, gelificarea începînd să devină evidentă după aproximativ 10 min. Se adaugă un strat de apă, iar gelificarea este totală după maximum 20 minute.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Fotografiile prezentate permit să se facă mai multe consideraţii generale. Astfel, în primul rînd, se poate constata marea capacitate de rezoluţie a gelului de poliacrilamidă, proteinele sarcoplasmatice fiind separate într-un număr de fracţiuni proteice care variază între 17 şi 22, în funcţie de condiţiile utilizate.

În al doilea rînd, apare evident faptul că o corectă caracterizare a unei soluții proteice eterogene nu poate fi făcută decît dacă se au în vedere mai mulți factori. Acești factori, ca : natura tamponului, pH-ul, concentrația proteinelor analizate, concentrația gelului de acrilamidă, respectiv mărimea porilor gelului, fac ca repartizarea fracțiunilor proteice, gradul de separare și claritatea imaginii fracțiunilor proteice separate să varieze în limite destul de largi.

Pentru claritatea expunerii rezultatelor, după prezentarea separărilor obținute în cele șase variante cercetate, vom discuta rezultatele în funcție de natura tamponului utilizat, pH-ul la care s-a efectuat electroforeza, concentrația poliacrilamidei și concentrația soluției proteice analizate. Vom face apoi, o privire generală asupra rezultatelor obținute.

Electroforeza în tampon de glicocol, pH 8,4. Cum rezultă din fotografiile date în fig. 2 și 3, în acest tampon, atît la o concentrație de poliacrilamidă de 5%, ca și de 7%, se separă practic așelași număr de fracțiuni, și anume 17, respectiv 20, iar aspectul general al imaginii electroforetice este asemănător. Se disting 4—5 fracțiuni principale, dintre care una anodică, precum și o serie de fracțiuni de intensitate variabilă care completează numărul fracțiunilor separate la 17, respectiv 20.

Electroforeza în tampon de TRIS-EDTA-borat, pH 8,4. În fig. 4 și 5 sînt redate separările obținute în aceste condiții. La o concentrație de 5% se separă 17, iar la aceea de 7% 20 fracțiuni proteice, dintre care patru principale — două catodice și două anodice.

Electroforeza în tampon de TRIS-EDTA-borat, pH 7,15. În acest tampon se separă, în funcție de concentrația gelului, 17 fracțiuni în cazul unui gel de 5%, și 22 fracțiuni în al celui de 7%. Dintre ele, șase sînt principale : două-trei catodice, una la mijlocul plăcii și două anodice (fig. 6 și 7).

După această sumară trecere în revistă a separărilor obținute în cele șase variante experimentale utilizate, să privim comparativ rezultatele obținute. După cum am amintit, dintre numeroșii factori care trebuie luați în considerare pentru caracterizarea exactă a unei soluții proteice complexe, noi am avut în vedere patru.

Natura tamponului. Deși numărul tampoanelor utilizate pentru electroforeza în poliacrilamidă este foarte ridicat, noi nu am utilizat decît două dintre ele — unul la două pH-uri. Aceasta, deoarece scopul principal al adaptării acestei tehnici, pe lîngă acela de a aduce date asupra compoziției proteinelor sarcoplasmatice, a fost — în ultimă instanță — localizarea și punerea în evidență a enzimelor și izoenzimelor care participă la glicoliză. Din acest punct de vedere, tamponul TRIS este unul dintre cele mai utilizate la determinarea activităților enzimatice. Deoarece însă boratul care intră în componența acestui tampon are o acțiune inhibitoare asupra unor enzime glicolitice, am utilizat și tamponul glicocol.

Descrierea exactă a fiecărei dintre numeroasele fracțiuni proteice separate fiind deosebit de dificilă, mai mult, inutilă, ne vom limita la descrierea modificărilor constatate în ceea ce privește viteza de migrare și numărul fracțiunilor principale. În funcție de viteza de migrare, dependentă în primul rînd de încărcarea electrică a proteinei respective și apoi de greutatea sa moleculară, de timpul de migrare, de temperatura de lucru, precum și de alți factori, distingem un grup de proteine puternic

încărcate electropozitiv, cu viteză de migrare mică — catodice, un grup intermediar şi unul cu viteză de migrare mare — anodice.

Cea mai semnificativă diferenţă în ceea ce priveşte aceste fracţiuni principale a fost constatată în cazul celor anodice. Astfel, în timp ce prin electroforeza în tamponul TRIS-EDTA-borat se separă două fracţiuni atît la pH 8,4 cît şi la pH 7,15, în cazul electroforezei în glicocol se separă numai una singură, indiferent de concentraţia gelului. De asemenea, în acest ultim tampon nu se distinge fracţiunea intermediară.

Influenţa pH-ului. Din aceleaşi considerente ca acelea expuse anterior şi anume posibilitatea de a localiza diverse enzime glicolitice, am efectuat electroforeza numai la pH 7,15 şi 8,4. Nu am distins modificări evidente ale spectrului electroforetic, pH-ul variind între limite relativ mici.

Concentraţia gelului. Prin modificarea raportului dintre acrilamidă şi bisacrilamidă există posibilitatea obţinerii unor geluri cu pori de diferite dimensiuni, ceea ce face ca efectului electroforetic să i se adauge şi acela de filtrare moleculară, de sită moleculară. Capacitatea de fracţionare a gelului de poliacrilamidă a fost testată cu geluri a căror concentraţie a variat între 1 şi 100%, dar separările optime au fost obţinute numai între concentraţii de 3 şi 10%, la concentraţii mici separîndu-se proteinele cu greutăţi moleculare mari [6].

În cazul lucrării de faţă, ne-am limitat la două concentraţii, 5 şi 7%, care de altfel sînt cele mai întrebuinţate şi în literatură. Diferenţele constatate în aceste condiţii se referă în special la fracţiunile principale anodice care sînt mai numeroase şi mai net separate în gelul de 5%, fapt care denotă că aceste proteine au greutăţi moleculare ridicate.

Concentraţia proteinei analizate. Pentru a avea o imagine simultană cît mai clară asupra separărilor obţinute, beneficiind de avantajul pe care îl are tehnica utilizată, am aplicat şase probe cu concentraţie crescîndă. Am avut astfel posibilitatea de a aprecia pe aceeaşi electroforegramă atît fracţiunile principale, cît şi cele mai slab evidenţiate. În afară de această posibilitate de identificare netă a fracţiunilor, electroforeza probelor aplicate în volume diferite, care au varait între 0,01 şi 0,1 ml a mai dus şi la o altă constatare, aceea că începînd de la 1,2 mg proteină, aplicate în 0,04 ml, primele fracţiuni anodice, în majoritatea cazurilor a doua şi a treia, încep să devină mai estompate, dispărînd chiar cu desăvîrşire la concentraţii mai mari. Dacă nu este luat în consideraţie, acest efect, care a fost constatat în cazul gelurilor cu o concentraţie de 7%, poate afecta caracterizarea unei soluţii proteice eterogene.

CONCLUZII

Electroforeza în gel de poliacrilamidă s-a dovedit a fi o metodă deosebit de eficace în separarea proteinelor sarcoplasmatice musculare care au fost fracţionate într-un număr de 17—22 fracţiuni proteice în funcţie de condiţiile utilizate.

Gradul de separare, repartizarea fracţiunilor, precum şi claritatea imaginii electroforetice depind de o serie numeroasă de factori dintre care în nota de faţă au fost analizaţi patru şi anume : natura tamponului,

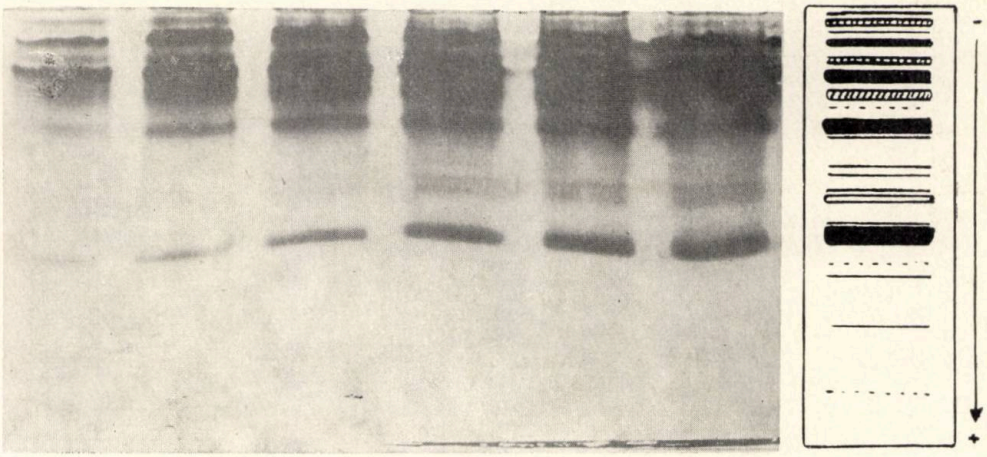


Fig. 2. — Electroforeza proteinelor sarcoplasmatice în tampon glicocol-TRIS, pH = 8,40, concentrația gelului 7 % la 26 mA, 620 V, în 80 de minute, la 4°C. S-au aplicat 0,01 ; 0,02 ; 0,04 ; 0,06 ; 0,08 ; și 0,1 ml din extractul muscular (0,3—3 mg proteină).

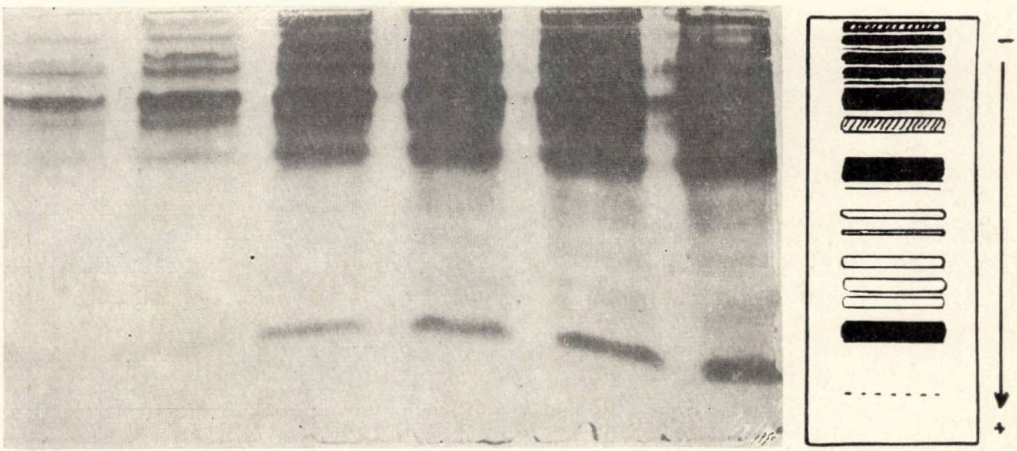


Fig. 3. — Electroforeza proteinelor sarcoplasmatice în tampon glicocol-TRIS, pH = 8,40, concentrația gelului 5 % la 25 mA, 650 V, în 70 minute, la 4°C. S-au aplicat 0,01 ; 0,02 ; 0,04 ; 0,06 ; 0,08 și 0,1 ml din extractul muscular (0,3—3 mg proteină).

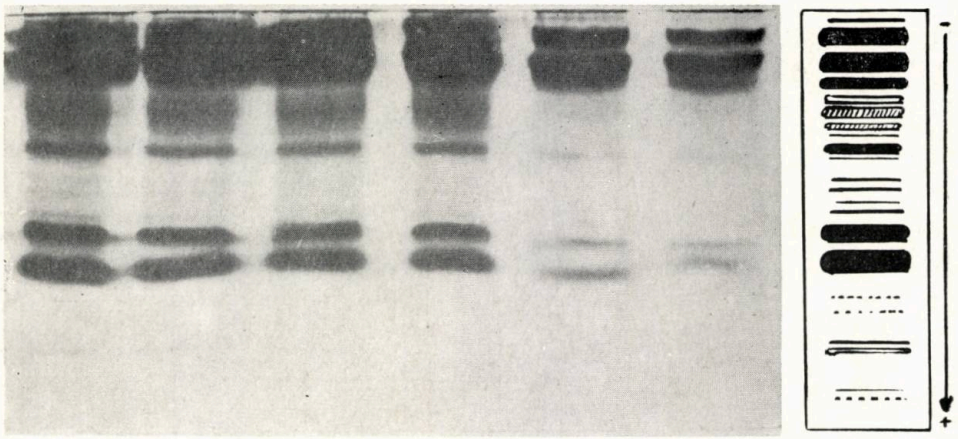


Fig. 4. — Electroforeza proteinelor sarcoplasmatice în tampon TRIS-EDTA-borat, pH = 7,15, concentrația gelului 7%, la 25 mA, 350 V, 180 minute, la 4°C. S-au aplicat 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 și 0,1 ml extract muscular (0,3—3 mg proteină).

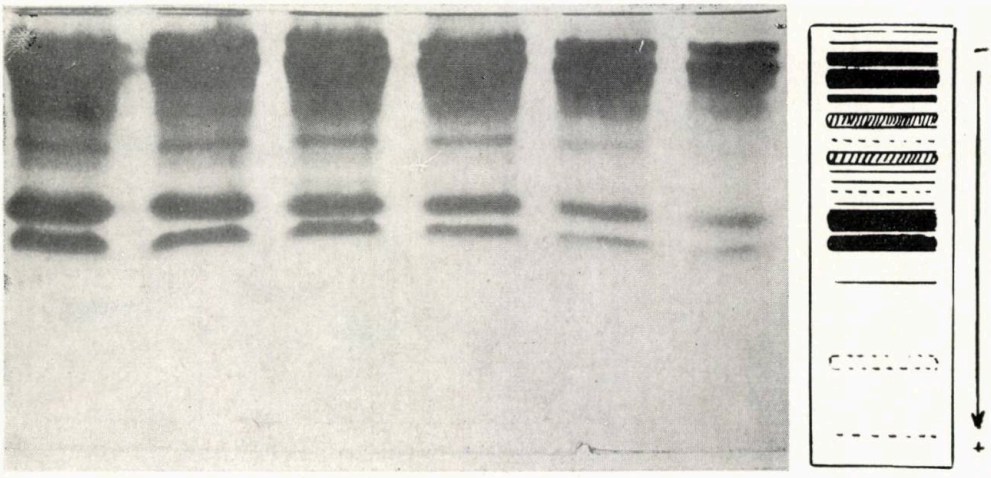


Fig. 5. — Electroforeza proteinelor sarcoplasmatice în tampon TRIS-EDTA-borat, pH = 7,15, concentrația gelului 5%, la 25 mA, 350 V, 145 minute, la 4°C. S-au aplicat 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 și 1,0 ml extract muscular (0,3—3 mg proteină).

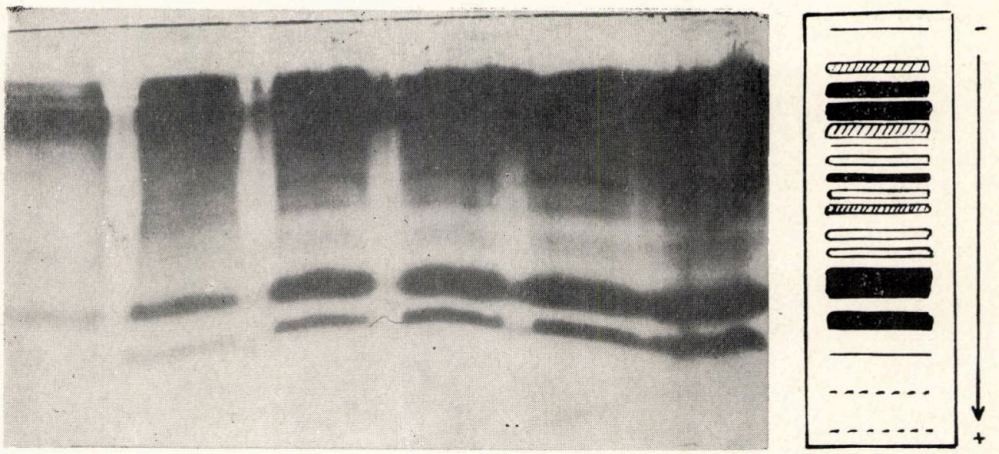


Fig. 6. — Electroforeza proteinelor sarcoplasmatice în tampon TRIS-EDTA-borat, pH = 8,40, concentrația gelului 7%, la 25 mA, 350 V, 155 minute, la 4°C. S-au aplicat 0,01 ; 0,02 ; 0,04 ; 0,06 ; 0,08 și 1,0 ml extract muscular (0,3—3 mg proteină).

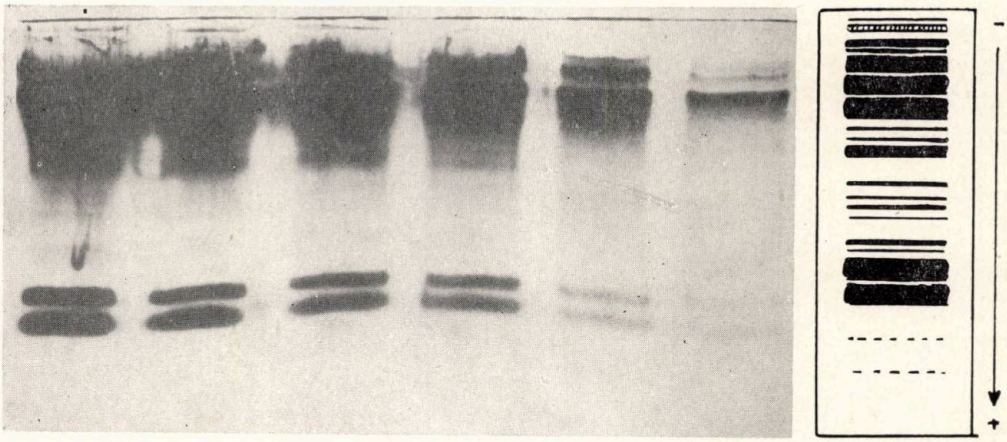


Fig. 7. — Electroforeza proteinelor sarcoplasmatice în tampon TRIS-EDTA-borat, pH = 8,40, concentrația gelului 5%, la 25 mA, 350 V, 135 minute, la 4°C. S-au aplicat 0,01 ; 0,02 ; 0,04 ; 0,06 ; 0,08 și 0,1 ml extract muscular (0,3—3 mg proteină).

pH-ul, concentrația gelului de poliacrilamidă și concentrația și volumul proteinei analizate.

Cele mai bune separări au fost obținute în tamponul TRIS-EDTA-borat, pH = 7,15 și cu o ceoncentrație a gelului de 7%.

Prezentat la redacție la 6 aprilie 1968

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. O. Smithies, *Zone electrophoresis in starch gels : group variations in the serum proteins of normal human adults*, Biochem. J. **61**, 629 (1955).
2. O. Smithies, *Zone electrophoresis in starch gels and its application to studies of serum proteins*, Adv. Prot. Chem. **14**, 65 (1959).
3. D. Tănăsescu, *Separation of sarcoplasmatic proteins of frog gastrocnemius on DEAE-Sephadex and their ultraviolet absorption spectra*, Rev. roum. biochim. **4**, 143 (1967).
4. D. Tănăsescu, *Participarea sistemului glicolitic în metabolismul muscular*, Teză de doctorat, București, 1968.
5. N. Moldoveanu, D. Tănăsescu, *Localizarea miokinasei, creatinkinazei, ATP-azei și AMP-dezaminazei în proteinele sarcoplasmatice musculare separate pe DEAE-Sephadex și prin electroforeză în gel de amidon*, 1968.
6. L. Ornstein, *Disc electrophoresis. I. Background and theory*, Ann. N. Y. Acad. Sci, **121**, 321 (1964).
7. B. J. Davis, *Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins*, Ann. N.Y. Acad. Sci. **121**, 404 (1964).
8. M. P. Tombs, *An electrophoretic investigation of groundnut proteins, the structure of Arachins A and B*, Biochem. J. **96**, 119 (1965).
9. J. Uriel, *Méthode d'électrophorèse dans des gels d'acryl-amide-agarose*, Bull. Soc. Chim. Biol. **48**, 969 (1966).
10. J. T. Clarke, *Simplified „disc" (polyacrylamide gel) electrophoresis*, Ann. N. Y. Acad. Sci. **121**, 428 (1964).
11. L. P. Akroyd, *Acrylamide gel slab electrophoresis in a simple glass cell for improved resolution and comparison of serum proteins*, Analyt. Biochem. **19**, 399 (1967).
12. R. Crok, Th. Bücher, *Crystallized enzymes from the myogen of rabbit skeletal muscle*, Adv. Prot. Chem. **15**, 315 (1960).

ELECTROPHORESIS IN POLYACRYLAMIDE GELS OF MUSCLE SARCOPLASMIC PROTEINS

SUMMARY

By means of a vertical electrophoresis in thin layer polyacrylamide gel, a number of 17—22 sarcoplasmic proteins, depending on the used conditions, have been fractionated.

The separation degree, fraction distribution as well as the brightness of the electrophoretic image depend on a large number of factors, among which the present paper studies only four, i.e. : buffer nature, pH, polyacrylamide gel concentration and the concentration and volume of analysed protein.

Taking into account the four factors considered, differences have been found as regards the distribution, the number and the brightness of the main proteic functions. Thus, while during the separation in TRIS-EDTA-borate buffer at pH 7.15 or 8.4 for a gel concentration of 5% as well as for 7%, two main anodic fractions appear, in the glycocoll buffer, pH 8.4, for both concentrations only one fraction appears.

The number of the main anodic fractions, which are more numerous and more clearly separated in gels with a 5% concentration, differs depending on gel concentration, which shows that these are proteins with high molecular weight.

As for the 7% gels, there has been found that applying samples in a volume greater than 0.04 ml (1.2 mg protein) a series of anodic proteic fractions are vanishing, and sometimes also completely disappear.

6th INTERNATIONAL CONGRESS OF CLINICAL CHEMISTRY. Al 6-lea Congres internațional de chimie clinică. München (R.F. a Germaniei) 26—30 iulie, 1966.

Materialele prezentate în cadrul celui de al 6-lea Congres de chimie clinică de la München, din 1966, au apărut în patru volume care aduc un aport informativ extrem de prețios biochimistului, biologului, fiziologului și medicului asupra rezultatelor obținute în chimia clinică modernă, asupra tendințelor, direcțiilor și perspectivei sale de dezvoltare.

În fiecare volum sînt prezentate lucrări in extenso, semnate de personalități notorii în domeniile respective, cît și rezumate ale comunicărilor scurte. Textele sînt însoțite de scheme, grafice și tablouri.

Fiecare lucrare in extenso este însoțită de o bibliografie care înlesnește cititorului o punere la punct asupra datelor esențiale ale problemei respective.

M. Zamfirescu-Gheorghiu

Vol. 1 : CLINICAL PROTEIN CHEMISTRY. Redactor : W.H. Hitzig, Zürich, S. Karger, Basel. New York, IV+119 p., 41 fig., 16 tab., 1968, US $ 8.90. (Chimia Clinică a Proteinelor)

Cartea cuprinde 8 comunicări principale, redate in extenso, și rezumatele altor 20 de comunicări.

Comunicările principale sînt semnate de personalități cu activitate bine cunoscută în domeniul chimiei proteinelor, și anume : A. Tiselius, *Metode moderne de separare a proteinelor ;* W. Putnam, *Formarea, structura și funcțiunile gamma-globulinelor* ; H.F. Deutsch, *Relații între praproteine și imunoglobulinele normale* ; W. H. Hitzig, *Efectul clinic al globulinelor serice normale* ; P. Grabar, *Aspecte noi ale analizei imunoelectroforetice* ; H.G. Schwick, *Metodele imunologice în chimia clinică.* Aceste comunicări sînt precedate de o introducere semnată de W. Grassman, în care se face o scurtă prezentare a evoluției cunoștințelor în domeniul proteinelor serice, cu referire specială la apariția noilor metode de investigație.

O bună parte a comunicărilor este închinată studiului imunoglobulinelor. F. Putnam acordă o deosebită atenție lanțului polipeptidic L, prezentînd date în legătură cu eterogenitatea acestui lanț, cu secvența aminoacizilor în porțiunile carboxi- și amino-terminale ale lanțului de tip kappa, cu natura schimbărilor de secvență, biosinteza și controlul genetic. Sînt prezentate foarte multe date originale, care se compară cu rezultatele obținute și de alți cercetători consacrați studiului structurii lanțului polipeptidic L și controlului genetic al biosintezei acestuia (C. Milstein, C. Baglioni și alții).

Comunicarea lui H.F. Deutsch, deși bogată în date și idei noi, nu aduce argumente decisive care să răspundă la întrebarea în ce măsură imunoglobulinele patologice sînt entități

structurale anormale sau numai produşi rezultaţi prin creşterea sintezei imunoglobulinelor normale.

Dintre comunicările scurte se relevă introducerea semnată de W. Roman, care însumează cunoştinţele actuale din domeniul electroforezei unor imunoglobuline normale şi patologice. Se remarcă încercarea de a clasifica diferitele forme pe care le îmbracă proteinele anormale la electroforeza pe acetat de celuloză. Majoritatea comunicărilor scurte prezintă aspecte metodologice legate de dozarea, izolarea şi caracterizarea unor proteine serice. Ne-a atras în mod special atenţia comunicarea lui W. Prellwitz şi C.H. Hammar, Cercetări asupra lanţurilor H şi L ale γ G-globulinelor normale, în care se încearcă o scindare enzimatică mai înaintată a celor două lanţuri polipeptidice. Din păcate, rezumatul nu dă nici un amănunt în legătură cu fragmentele rezultate.

Încheind, vom aminti că volumul cuprinde şi o lucrare românească, în care S. Ilca de la Spitalul din Lugoj prezintă un nou reactiv (citratul feric amoniacal) pentru studiul unor fracţiuni proteice atipice.

Victor Gheţie

Vol. 2 — CLINICAL ENZYMOLOGY. Redactor: F.W. Schmidt, Hannover; S. Karger, Basel, New York, IV+160 p. 50 fig., 19 tab., 1968, US $ 11.50 (Enzimologie clinică).

Th. Bucher, E. Schmidt şi F.W. Schmidt precizează în introducere cele două teme generale ale biologiei enzimelor — structură şi distribuţie — patologia enzimatică, referindu-se la atipiile acestor două aspecte şi la bazele lor genetice. Tot aici sînt sistematizate cauzele modificărilor enzimatice plasmatice, ca reflectare a lezării diferitelor organe. Mai departe F. W. Schmidt expune sintetic, prin scheme şi diagrame, modelele enzimatice tisulare cu valoare diagnostică.

G. Pfleiderer se ocupă de biochimia şi valoarea diagnostică a izoenzimelor, incluzînd în esenţă datele tehnico-metodologice necesare separării, caracterizării şi evaluării formelor moleculare multiple ale enzimelor. Se stabilesc condiţiile indispensabile pentru precizarea importanţei fiziologice a izoenzimelor, a modelelor de distribuţie ale acestora, diferite după organ şi ţesut, proprietăţi chimice, fizice, control genetic. Se tratează pe larg izoenzimele LDH (lacticodehidrogenaze) şi se expun achiziţiile recente asupra acestor izoenzime, ca şi asupra determinismului lor genetic şi a caracterelor lor imunologice diferite.

În continuare, G. Wieme prezintă progresele realizate în izoenzimologia diagnostică, dezvoltînd procedeele analitice şi aplicările lor diagnostice, cu referire la izoenzimele LDH, la fosfatazele nespecifice, la creatinchinază, aldolaze, leucinaminopeptidază (LAP), alfa-amilază, pseudocolinesterază etc.

Foarte pe larg, B. Cinader expune problema anticorpilor specifici, ca factor de inhibiţie enzimatică, şi rolul lor în clasificarea erorilor înăscute de metabolism, arătînd că anticorpii afectează activităţile enzimatice prin obstacol steric şi prin schimbări configuraţionale. Obstacolul steric împiedică accesul substratului la sediul activităţii catalitice. Capacitatea de inhibiţie prin anticorp depinde de distanţa dintre aria catalitică şi determinantul antigenic al proteinenzimei.

În cîteva capitole mai mici se aduc date asupra lactatdehidrogenazei şi izoenzimelor sale în distrofia musculară (J.W. Boyd), asupra diferenţelor de comportare electroforetică a

amilazelor serice (S. Hayashi şi colab.), urmate de o serie de comunicări scurte, dintre care citäm : studiile asupra mecanismului de activare şi inhibiţie a fosfatazei alcaline (W. Gross şi colab.) şi studiul asupra acetilcolinesterazelor specifice din serul uman (W. Pilz).

Foarte interesant este şi studiul asupra valorii clinice a 5'-nucleotidazei serice în diagnosticul diferenţial al afecţiunilor hepato-biliare (J. R. Hobbs şi colab.).

Vol. 3 — PROGRESS IN CLINICO-CHEMICAL METHODS. Redactor : H. Büttner, Kiel, S. Karger, Basel, New York, IV + 107 p., 49 fig., 8 tab., US $ 8.15. (Progrese în metodele chimiei clinice)

După o scurtă introducere în care S. Natelson precizează o parte din tendinţele actuale ale metodicei chimiei clinice (micrometode, automatizare), urmează cîteva capitole mari rezervate metodelor actuale de mare perspectivă.

M. Rubin prezintă caracteristicile şi bazele instrumentale ale fluorometriei, cu informaţii asupra combinării aplicate a fluorescenţei şi enzimologiei la dozări de amoniac, uree, glucoză, sisteme enzimatice NADH dependenta, ca : lacticodehidrogenaza, aspartat-transaminaza. Simplitatea procedeelor, specificitatea lor absolută de substrat, scara de mărime — de ordinul microlitrilor — a volumelor puse în lucru, adaptabilitatea la nevoile chimiei clinice prin tehnici automatizate, asigură un loc de frunte analizei fluorometrice în viitor.

E. Bayer expune avantajele cromatografiei în fază gazoasă, comparîndu-le cu acelea ale cromatografiei în fază lichidă. Este de asemenea prezentată şi combinaţia cromatografie în fază gazoasă-spectrometrie de masă. Se descrie un detector de microabsorbţie, aplicabil în cromatografia în fază lichidă, cu o sensibilitate de 10^{-10} g/secundă.

A. E. Kellie arată că extinderea cromatografiei în fază gazoasă a steroizilor este în creştere, ca urmare a dezvoltării detectorilor prin captură electronică şi a aplicării metodelor spectrografiei de masă.

F. M. Matschinsky şi colab. expun aplicarea tehnicii fluorometrice în histochimia cantitativă a enzimelor, a intermediarilor metabolici şi a cofactorilor implicaţi în glicoliză.

E. Stahl se ocupă de progresele realizate în domeniul cromatografiei în strat subţire, recomandînd pentru identificarea substanţelor separate combinarea procedeelor chimico-fizice cu cele biologice. Se discută de asemenea posibilitatea de a se obţine spectre directe, în lumină vizibilă şi în UV, cît şi spectre de fluorescenţă ale materialului separat prin cromatografia în strat subţire.

În final este expusă discuţia de la o masă rotundă asupra tehnicilor care folosesc în chimia clinică volume de ordinul microlitrilor, la care au participat H. Matrenheimer, M. Roth, G. Frei şi alţii.

Vol. 4 — ADVANCES IN CLINICO-BIOCHEMICAL RESEARCH. Redactor : I. Weiss, Munich, S. Karger, Basel, New York, IV + 100 p., 31 fig., 13 tab., US $ 7.45. (Progrese în cercetarea de biochimie clinică)

În introducerea volumului, F. Lynen subliniază faptul că în prezent studiile proceselor metabolice elementare se apropie de sfîrşit şi că sîntem în faţa cercetării corelaţiilor intermetabolice, raportul între biochimia fundamentală şi cea clinică fiind acela de donor-acceptor, iar impulsurile stimulatoare venind în ambele sensuri.

În cuprinsul volumului sînt tratate subiecte de mare actualitate și interes pentru rezolvarea unor probleme biologice-medicale, dintre care semnalăm cîteva.

Astfel, sub semnătura lui E. J. Stanbury sînt expuse date referitoare la iodo-proteinele glandei tiroide, normale și patologice. Sînt semnalate în patologia tiroidei modificări ale concentrației tiroglobulinei, ale unui complex iodoproteic dens, ale iodoprealbuminei, ale unei iodoproteine cu caracter special de solubilitate și ale unei specii de tiroglobulină cu rezistență alterată la tripsină și chimotripsină.

T. K. Vith, în baza unei experiențe de 20 ani și a datelor din literatura „exploziv" dezvoltată în problemele pigmenților biliari, face o expunere consistentă a chimiei clinice a acestora.

U. Gerlach și colab. expun acțiunea substanțelor antireumatice asupra metabolismului colagenului și acizilor nucleici din țesutul de granulație. În concluzia lucrării se subliniază că sinteza colagenului este deprimată diferit sub acțiunea fenilbutazonei sau oxifenil-butazonei și că radioactivitatea specifică a mRNA crește în țesutul de granulație sub influența fenilbutazonei.

H. B. Goedde și colab. prezintă studii genetice asupra unui sindrom interesant, mai puțin cunoscut, anume sindromul urinar „Maple Syrup" (al sucului de arțar). Este vorba de eliminarea urinară de oxoacizi cu lanț de carbon ramificat. Eliminările acestea pun în valoare deficiența — genetic determinată a unor enzime care, în mod normal, catalizează degradarea aminoacizilor : leucină, izoleucină și valină. Urina miroase a suc de arțar, de unde se trage și numele sindromului.

Într-o expunere foarte bine documentată, I. Ružďyč și colab. prezintă o lucrare asupra anomaliilor de compoziție ale hemoglobinei.

M. Zamfirescu-Gheorghiu

PROCEEDINGS OF THE NINTH INTERNATIONAL CANCER CONGRESS (Lucrările celui de al IX-lea Congres Internațional de Cancer), sub redacția R. J. C. Harris, Seria Monografii, vol. 9 (126 pag.) și vol. 10 (287 pag.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1967.

O parte din rapoartele cele mai valoroase prezentate la cel de al IX-lea Congres internațional de cancer, ținut la Tokio în octombrie 1966, a fost publicată în seria monografiilor redactate de Uniunea internațională contra cancerului. Ele se datoresc unor personalități marcante, cu prestigiu și experiență îndelungată în diferite domenii ale problemei cancerului.

În vol. 9, o lucrare deosebit de valoroasă o constituie raportul despre „Carcinogeneza virală" prezentat de R. Dulbecco. Problema carcinogenezei virale este importantă nu numai pentru stabilirea mecanismului cancerizării, dar și pentru faptul că apariția unei tumori virotice poate fi prevenită, în principiu, prin imunizare, în momentul în care agentul virotic este cunoscut. Virusurile oncogene ce conțin ADN (virusul polioma, adenovirusul SV_{40} etc.) au proprietăți biologice diferite de cele ale virusurilor cu ARN (virusul Rous, virusul leucemiei puilor de găină etc.), fapt care arată de la început necesitatea unor căi diferite de studiu al acestora.

Raportul „Imunologia cancerului" (G. Klein) dezbate următoarele aspecte : studiul antigenilor specifici tumorali, pentru înțelegerea fenotipului celulei tumorale ; comportarea antigenică a unor tipuri de tumori de origine necunoscută ; utilizarea proprietăților imunologice

în prevenirea măcar a unor forme de tumori; valoarea imunoterapiei ca adjuvant al altor forme terapeutice.

Aberațiile cromozomiale și cancerul (Jérôme Lejeune) constituie subiectul unui alt raport interesant, prezentat la congres. Deși de foarte multă vreme se spune că există aberații cromozomiale în țesutul canceros, precizarea lor nu este încă făcută, dar s-a constatat că la persoane prezentînd diverse anomalii cromozomiale există o frecvență mai crescută a neoplaziilor.

Un raport deosebit de important pentru biochimiști este cel intitulat „Bazele moleculare ale translației mesajului genetic" prezentat de Severo Ochoa. Se discută cele două trepte implicate în transmiterea informației genetice, transcripția (sinteza de ARN-m pe templetul de ADN) și translația (sinteza de polipeptide prin aranjarea aminoacizilor pe templetul de ARN, într-o secvență determinată de secvența nucleotidică a mesagerului), iar 9 diagrame și 10 tabele ilustrează mecanismul molecular al translației mesajului genetic.

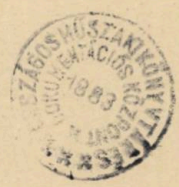
În vol. 10 se abordează aspecte clinice și epidemiologice ale cancerului. O problemă căreia i se acordă mai multă importanță este aceea a patogenezei și epidemiologiei cancerului de stomac; se discută aspectele histogenetice (M. Kuru și R. Sano), factorii etiologici (J. Higginson), incidența cancerului gastric în diferite părți ale globului (T. Hirayama, A. Chaklin, E. A. Saken) și mortalitatea prin cancerul de stomac (M. Segi).

Se prezintă un raport privind tehnicile de detectare a cancerului în diferitele sale localizări, în perioada în care simptomele clinice lipsesc (examene citologice, bioptice, radiologice).

Interesantă este abordarea problemei cancerizării prin radiații. Se aduc date privind incidența cancerului la pacienți care au făcut radioterapie pentru tratamentul spondilozei (leucemie), la persoane iradiate în copilărie pentru timus hipertrofic (cancer tiroidian), la supraviețuitorii exploziilor bombei atomice de la Hiroshima și Nagasaki (leucemie, cancer tiroidian), la minerii care extrag material radioactiv (cancer pulmonar).

Se discută problema campaniei contra fumatului în diferite țări (Statele Unite, Anglia, Danemarca, Canada); se evidențiază rolul medicilor și al educatorilor în campania contra fumatului în rîndurile tineretului.

M. Furnică



„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : Viaţa ştiinţifică, în care, prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. Recenzii — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 63, Sectorul I.

1968 SEP 17

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA
ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii ribonucleici celulari şi virali,** 1966, 25 × 17,50, 375 p., 8 pl. legat, anvelopă, 26 lei.

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţa şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie,** 1966, 25 x 17,50, 285 p., 18 pl., legat, anvelopă. 27 lei

ION CANTACUZINO, **Opere alese. Œuvres choisies,** 1965, 25 × 17,50, 687 p., legat anvelopă, 44 lei.

* * * **Omagiul acad. prof. RALUCA RIPAN,** 1966, 30,50 × 21,50, 628 p. + 2 pl., legat, anvelopă, 50 lei.

ST. CERC. BIOCHIM. TOMUL 11, NR. 3, P. 209—326, BUCUREŞTI, 1968

I.P. Informaţia c. 5577 | 43816 | **Lei 12.—**

F 1330

studii şi cercetări de biochimie

4

TOMUL 11
1968

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
St. cerc. biochim., tomul 11, nr. 4, p. 327—438, Bucureşti, decembrie 1968

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU.

Secretar de redacție:

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 48 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se fac prin CARTIMEX, Căsuța poștală 134—135, București, Republica Socialistă România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie".

ADRESA REDACȚIEI:

București, Str. Docenților nr. 20
Sectorul 1

F 1330

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tom. 11, nr. 4 1968

SUMAR

Pag.

EUGEN MACOVSCHI şi SIMONA CEAUŞESCU, Concentraţia sucurilor provenite din frunze iradiate cu radiaţii ultraviolete. Consideraţii în lumina teoriei biostructurii 331

E. MACOVSCHI şi ANGELA MIHĂESCU, Cantitatea şi concentraţia sucurilor provenite din frunze de varză încălzite la temperaturi diferite. Consideraţii în lumina teoriei biostructurii 337

I. NIŢULESCU, GH. CHERA şi L. RĂILEANU, Respiraţia tisulară hepatică la şobolanii intoxicaţi prin tetraclorură de carbon 343

VICTORIA ALEXANDRESCU, Raportul antigenic dintre proteinele solubile din endospermul, scutelul seminţei şi alte formaţiuni şi organe ale porumbului 349

VICTORIA ALEXANDRESCU şi IOANA CĂLIN, Electroforeza şi imunoelectroforeza proteinelor din endospermul şi scutelul seminţei germinate şi raporturile antigenice cu alte formaţiuni şi organe ale porumbului . . . 355

H. ARAŢEI şi ALICE KAPRI, Acţiunea unor reactivi chimici asupra proteinelor celulare în procesul fixării. I. Date cantitative cu privire la acţiunea alcoolului, acetonei şi acidului monoiodacetic asupra aminoacizilor liberi şi hidrolizatului proteic 363

GH. BUDOI şi S. K. RIES, Absorbţia simazinului radioactiv în plantele de secară şi creşterea conţinutului de proteină prin aplicarea atrazinului. . 371

MARIA FURNICĂ, Caracterizarea spectrofotometrică a ADN după iradiere *in vivo*. V. Fracţionarea ADN extras din ficatul şobolanilor normali sau iradiaţi, pe coloană de albumină metilată 377

VICTOR GHEŢIE, Caracterizarea imunoelectroforetică a lanţurilor polipeptidice şi a fragmentelor IgG de iepure 385

CONSTANŢA HALER, ASPAZIA BUSUIOC şi LEONID ABABEI, Modificări în activitatea adenozindeaminazei din eritrocite şi ficat şi a 5'-AMP-deaminazei sub influenţa radiaţiilor ionizante 391

CORINA IORDACHE, Activitatea ribonucleazelor din muşchiul sartorius de broască în stare normală şi în miotonia experimentală 399

ADELA ŞTEFAN şi MARIA IONESCU, Studiul cromatografic al aminoacizilor din hemolimfa larvelor de *Agrotis segetum* Schiff şi influenţa tratamentului cu Detox 25 407

IOANA TĂNASE şi VICTORIA MOCANU, Studii comparative privind unele aspecte biochimice din scoarţa unor sorturi şi clone de plop, cultivate în ţara noastră. Nota I 413

DINU TĂNĂSESCU şi TRAIAN BENŢIA, Separarea prin cromatografie în strat subţire de silicagel a compuşilor imidazolici din muşchii şi ficatul de şobolan 421

RECENZII 427

St. cerc. biochim., tomul 11, nr. 4, p. 327–438, Bucureşti, decembrie 1968

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tomul 11, nr. 4 1968

CONTENTS

Pag.

EUGEN MACOVSCHI, SIMONA CEAUŞESCU, Concentration of saps from ultraviolet irradiated leaves. Some considerations in the light of the biostructure theory 331

E. MACOVSCHI, ANGELA MIHĂESCU, Amount and concentration of saps from cabbage leaves heated at different temperatures. Some considerations in the light of the biostructure theory 337

I. NIŢULESCU, GH. CHERA, L. RĂILEANU, Hepatic tissue respiration in rats intoxicated with carbon tetrachloride 343

VICTORIA ALEXANDRESCU, The antigenic relations between soluble proteins from the endosperm, seed scutel and other parts and organs of the maize 349

VICTORIA ALEXANDRESCU, IOANA CĂLIN, Electrophoresis and immunoelectrophoresis of proteins from the endosperm and germinated seed scutel and their antigenic relations with other parts and organs of the maize 355

H. ARAŢEI, ALICE KAPRI, The reaction of some chemical reagents on cell proteins in the fixation process. I. 363

GH. BUDOI, S. K. RIES, Experiments regarding the absorption of radioactive simazine and the increase of protein content due to atrazine application to rye plants 371

MARIA FURNICĂ, DNA spectrophotometric characterization after irradiation *in vivo*. V. Fractionation of DNA extracted from the liver of normal or irradiated rats on methylated albumin columns 377

VICTOR GHEŢIE, The imunoelectrophoretic characterization of polypeptide chains and fragments of the rabbit IgG 385

CONSTANŢA HALER, ASPAZIA BUSUIOC, LEONID ABABEI, Changes in the activity of adenosine deaminase in erythrocytes and in liver and of 5′ AMP deaminase under the influence of ionizing radiations 391

CORINA IORDACHE, The activity of ribonucleases from frog sartorius muscle in normal state and in myotonia experimentalis 399

ADELA ŞTEFAN, MARIA IONESCU, The chromatographic study of amino acids from the grubs' hemolymph of *Agrotis segetum* Schiff and the influence of Detox 25 treatment 407

IOANA TĂNASE, VICTORIA MOCANU, Comparative studies on some biochemical indices concerning the bark of different poplar clones and varieties in Romania. I. 413

DINU TĂNĂSESCU, TRAIAN BENŢIA, Separation of imidazole compounds of rat liver and muscle by thin layer chromatography on silicagel . . . 421

BOOK REVIEWS. 427

St. cerc. biochim., tomul 11, nr. 4, p. 327–438, Bucureşti, decembrie 1968

ST. CERC. BIOCHIM. **11**, *4*, 331 – 335 (1968)

CONCENTRAȚIA SUCURILOR PROVENITE DIN FRUNZE IRADIATE CU RADIAȚII ULTRAVIOLETE

CONSIDERAȚII ÎN LUMINA TEORIEI BIOSTRUCTURII

EUGEN MACOVSCHI și SIMONA CEAUȘESCU

Rezumat. — Cercetările efectuate pe frunze de varză albă, varză roșie, salată verde și spanac au arătat că iradierea lor cu radiații ultraviolete duce la creșterea indicilor de refracție ai sucurilor ce pot fi stoarse din aceste frunze la 300 atm și că sucurile stoarse din frunze după 3 ore de la iradiere au indicele de refracție normal. Interpretarea acestor rezultate în lumina teoriei biostructurii duce la concluzia că radiațiile ultraviolete provoacă o destrămare parțială și reversibilă a biostructurii frunzelor cercetate.

Conform concepției noastre, o parte din materia care alcătuiește protoplasma este integrată într-o structură cu totul specială — biostructura —, caracteristică numai viului, care se destramă o dată cu moartea și pune în libertate componentele din care este alcătuită [4], [5]. Or, dacă materialul viu, care conține biostructura, răspunde la excitații, iar materialul biologic omorît, în care biostructura nu mai există, nu răspunde, se poate conchide că însușirea viului de a răspunde la excitații se datorește tocmai biostructurii cuprinse în el.

Putem intui modificările care se produc la nivelul biostructurii sub acțiunea excitațiilor dacă ținem seama de faptul că excitațiile prea puternice sînt mortale, adică provoacă destrămarea înaintată și ireversibilă a biostructurii. Înseamnă că și excitațiile slabe, nemortale, după încetarea cărora materialul excitat revine la starea inițială, tind și ele să destrame biostructura, dar o destramă numai parțial, ceea ce permite refacerea biostructurii după terminarea excitației.

Pentru verificarea supoziției de mai sus s-ar putea proceda ca în cazul cercetării felului în care biostructura din frunzele diferitelor plante se comportă la temperaturi ridicate. Într-adevăr, de la o anumită temperatură în sus (temperatura mortală minimă), frunzele dau prin stoarcere (de exemplu la 300 atm) cantitatea de suc mai mare și sucul astfel obținut conține mai multe substanțe hidrosolubile decît cel rezultat din frunzele neîncălzite. După teoria biostructurii, surplusul acesta se datorește apei și substanțelor hidrosolubile eliberate prin destrămarea biostructurii, care s-a produs o dată cu moartea frunzelor, provocată prin încălzire [6].

Dacă o dată cu moartea frunzelor biostructura lor se destramă și eliberează apa și diferite substanțe din care este alcătuită, este de așteptat

ca, într-o măsură mai mică, o astfel de eliberare să aibă loc și în cazul excitațiilor nemortale. Prin urmare, sucul obținut din frunzele excitate (în timpul sau imediat după excitație) ar trebui să aibă altă compoziție decît sucul obținut din frunzele martor, neexcitate. Astfel, cercetarea comparativă a cantității, concentrației, și compoziției sucurilor obținute în condițiile menționate ar putea da indicații cu privire atît la destrămarea parțială a biostructurii, provocată de excitații nemortale, cît și la substanțele care sînt eliberate din această structură.

Printr-un procedeu asemănător s-ar putea constata dacă o astfel de destrămare parțială a biostructurii, provocată de excitații nemortale, este sau nu reversibilă. În cazul reversibilității ar trebuica sucul, obținut din frunze la un interval de timp îndeajuns de îndelungat după excitare ca să permită refacerea biostructurii să aibă aceeași compoziție ca și sucul obținut din frunze neexcitate. Așadar, cercetarea comparativă a cantității, concentrației și compoziției sucurilor obținute în aceste condiții ar putea da indicații privind atît reversibilitatea sau nereversibilitatea procesului de destrămare parțială a biostructurii, provocat de excitații nemortale, cît și viteza procesului de refacere a biostructurii după încetarea excitării.

MATERIAL ȘI METODE DE LUCRU

Pornind de la considerațiile de mai sus, am cercetat deocamdată numai cantitatea și concentrația sucurilor ce se obțin din frunzele de varză albă (*Brassica oleracaea* L. var. *capitata* D C. f. *alba)* și varză roșie *(Brassica oleracaea* L. var. *capitata* D C. f. *rubra*). scoase din căpățîni, precum și din frunze proaspete de spanac (*Spinacea oleracaea* L.) și salată (*Lactura sativa* L.) neiradiate și iradiate cu radiații ultraviolete. Alegerea acestor radiații ca agent excitant a fost determinată de faptul că ele nu omoară materialul vegetal dacă sînt aplicate în doze moderate [1], [2], [3].

Dat fiind că frunzele reprezintă un material biologic neuniform, unele fiind mai tinere, altele mai bătrîne, mai mici și mai mari, mai hidratate și mai uscate etc., trebuia să recurgem la un procedeu care să asigure comparabilitatea rezultatelor experimentale în condiții optime. În acest scop, fiecare frunză se tăia longitudinal în două, nervura principală fiind îndepărtată; una din jumătăți intra în alcătuirea probei ce nu se iradia (proba martor), iar cealaltă în alcătuirea probei ce se supunea acțiunii radiațiilor ultraviolete (proba iradiată). Dat fiind că frunzele odată desprinse de pe plantă își pierd relativ repede apa, ele se introduceau imediat după recoltare în pungi de material plastic, iar jumătățile tăiate se introduceau și ele în alte pungi de material plastic, unde se păstrau pînă la prelucrare, care și ea se făcea cît mai curînd cu putință. Fiecare probă cuprindea cîte 200 g material vegetal.

Iradierea se făcea cu lampa „Solimed Quarzlampe — Bruno Höpfel, Mecklenburg" și dura, în general, 10 min, frunzele fiind plasate sub lampă la distanța de 50 cm. Se înțelege că iradierea începea după ce lampa intra în regimul normal.

Frunzele din probele neiradiate se etalau pe o masă vecină, în acelaş mod şi pentru acelaşi interval de timp ca şi cele care se iradiau.

Stoarcerea probelor se realiza cu o presă hidraulică manuală de laborator, tip Hafico, model 2 litri. Presiunea se ridica pînă la 300 atm şi se menţinea pînă cînd materialul înceta să mai cedeze suc (15 min erau, în general, de ajuns).

Cantitatea sucului obţinut se măsura cu cilindrul gradat şi se exprima în mililitri, iar concentraţia lui globală se determina refractometric, după centrifugare, cu ajutorul unui refractometru Abbe, model Carl Zeiss Jena, şi se exprima convenţional în grame zaharoză la 100 ml suc, după tabelele lui Wagner [7].

REZULTATELE OBŢINUTE ŞI SEMNIFICAŢIA LOR

Unele din rezultatele obţinute prin analiza sucurilor stoarse din frunze imediat după iradiere, precum şi din frunzele martor sînt prezentate în tabela 1.

Se constată că volumele sucurilor sînt asemănătoare, diferenţele fiind de ordinul erorilor experimentale. Rezultă că, în condiţiile în care am lucrat, radiaţiile ultraviolete nu provoacă eliberarea apei din biostructura frunzelor cercetate sau, mai precis, nu duc la eliberarea apei în cantitate sesizabilă prin mijloacele de cercetare pe care le-am folosit.

În schimb, indicii de refracţie ai sucurilor obţinute din frunzele iradiate sînt mai mari decît aceia ai sucurilor provenite din frunzele martor. Deosebirile apar şi mai net cînd concentraţiile sucurilor sînt exprimate convenţional în grame zaharoză la 100 ml suc : se vede că în urma iradierii concentraţia sucurilor poate deveni de patru ori mai mare. Faptul acesta poate fi explicat admiţînd că sub acţiunea excitantă a radiaţiilor ultraviolete biostructura frunzelor eliberează cantităţi apreciabile de substanţe hidrosolubile.

Remarcăm cu această ocazie că indicii de refracţie ai sucurilor obţinute din cîte două probe de frunze, ambele neiradiate, nu prezintă deosebiri semnificative, ceea ce arată că concentraţiile sucurilor provenite din jumătăţi ale aceloraşi frunze sînt practic egale.

În tabela 2 sînt prezentate unele rezultate obţinute în 6 experienţe cu cîte două probe paralele de frunze de varză roşie, pentru a compara, pe de o parte, concentraţia sucului frunzelor neiradiate cu aceea a sucului stors imediat după iradiere, iar pe de altă parte concentraţia acestuia din urmă cu aceea a sucului stors după 1 sau 3 ore de la iradiere.

Se constată (experienţele 1 şi 2) că, întocmai ca în încercările anterioare (tabela 1), iradierea determină o creştere a indicelui de refracţie, deci şi a concentraţiei sucului respectiv, dar că, pe măsură ce intervalul de timp dintre iradiere şi stoarcere se prelungeşte (experienţele 3—6), indicele de refracţie, deci şi concentraţia sucului, manifestă o tendinţă accentuată de revenire la valori de ordinul de mărime al celor constatate la sucul frunzelor neiradiate. Acest fapt, poate fi explicat admiţînd că biostructura celulelor foliare, destrămată parţial sub acţiunea radiaţiilor ultraviolete, se reface cu timpul.

Tabela 1

Cantităţile, indicii de refracţie şi concentraţiile sucurilor obţinute prin stoarcerea la 300 atm a probelor de cite 200 g frunze de varză albă, varză roşie, salată verde şi spanac, fără iradiere şi după iradiere cu radiaţii ultraviolete, la 50 cm distanţă de la lampă, timp de 10 min. (octombrie 1967)

Nr. crt.	Frunze de	Cantitatea sucului ml			Indicele de refracţie al sucului n			Concentraţia sucului, exprimată în grame zaharoză la 100 ml suc		
		frunze neiradiate a	frunze iradiate b	diferenţa $b-a$	frunze neiradiate a	frunze iradiate b	diferenţa $b-a$	frunze neiradiate a	frunze iradiate b	raportul $\frac{b}{a}$
1	Varză albă	22	20	−2	1,3340	1,3370	+0,0030	0,61	2,70	4,4
2	,, ,,	49	52	+3	1,3377	1,3382	+0,0005	3,17	3,51	1,1
3	Varză roşie	21	25	+4	1,3350	1,3360	+0,0010	1,26	1,98	1,8
4	,, ,,	43	40	−3	1,3343	1,3370	+0,0027	0,81	2,70	3,3
5	Salată verde	67	68	+1	1,3340	1,3360	+0,0020	0,61	1,98	3,2
6	,, ,,	58	57	−1	1,3342	1,3347	+0,0005	0,74	1,08	1,4
7	Spanac	36	35	−1	1,3355	1,3366	+0,0011	1,62	2,43	1,5
8	,,	39	36	−3	1,3350	1,3362	+0,0012	1,26	2,16	1,7

Tabela 2

Indicii de refracţie şi concentraţiile sucurilor obţinute prin stoarcerea la 300 atm a probelor de cite 200 g frunze de varză roşie neiradiate şi iradiate. Unele probe de frunze iradiate au fost stoarse imediat, iar altele după o oră, respectiv după 3 ore de la iradiere. Durata iradierii cu radiaţii ultraviolete : 10 min, la distanţa de 50 cm de la lampă (noiembrie 1967)

Nr. crt.	Indicii de refracţie ai sucurilor stoarse				Concentraţiile exprimate în grame zaharoză la 100 ml suc stors			
	din frunze neiradiate	imediat după iradiere	după o oră de la iradiere	după 3 ore de la iradiere	din frunze neiradiate	imediat după iradiere	după o oră de la iradiere	după 3 ore de la iradiere
1	1,3385	1,3410	—	—	3,78	5,50	—	—
2	1,3383	1,3412	—	—	3,60	5,63	—	—
3	—	1,3400	1,3390	—	—	4,78	4,10	—
4	—	1,3398	1,3390	—	—	4,63	4,10	3,38
5	—	1,3397	—	1,3380	—	4,57	—	3,51
6	—	1,3400	—	1,3382	—	4,78	—	

CONCLUZII

Conform datelor experimentale prezentate în această lucrare, frunzele de varză albă, varză roşie, salată şi spanac iradiate cu radiaţii ultraviolete dau prin stoarcere la 300 atm aceeaşi cantitate de suc ca şi frunzele neiradiate. În schimb, indicii de refracţie ai sucurilor provenite din frunzele iradiate sînt mai mari decît cei ai sucurilor stoarse din frunze neiradiate. S-a mai constatat că indicii de refracţie ai sucurilor stoarse după diferite intervale de timp de la iradiere sînt mai mici decît aceia ai sucurilor stoarse imediat după iradiere, aşa că la sucurile obţinute după trei ore de la iradiere indicii de refracţie sînt la fel cu aceia ai sucurilor obţinute din frunzele neiradiate.

Interpretarea acestor date prin prisma teoriei biostructurii duce la concluzia că biostructura frunzelor cercetate este sensibilă la acţiunea excitantă a radiaţiilor ultraviolete, se destramă parţial prin iradiere, eliberînd unele componente hidrosolubile din care este alcătuită, şi că procesul acesta este reversibil, biostructura refăcîndu-se pe încetul, după încetarea iradierii.

Prezentată la redacţie la 1 august 1968

Universitatea Bucureşti
Facultatea de biologie
Catedra de biochimie

BIBLIOGRAFIE

1. Ciub D., *Ultrafioletovye luci i razvitie rastenii, Kukuruza, 8*, 45 (1963).
2. Dubrov A. P., *Deistvie ultrafioletovoi radiaţii na rastenia*, D.A.N.
3. Henri V., *Excitabilité des organismes par les rayons ultraviolets*, C.R. Acad. Sci. *154*, 88 (1912).
4. Macovschi E., *Die lebende Materie und ihre Entstehung*, Revue de Chimie *4*, 11 (1959).
5. Macovschi E., *Unele probleme ale mecanismelor de reglare şi ale structurii materiei vii*, St. cerc. biochim. *8*, 253 (1965).
Some problems of regulation mechanisms and of living matter structure, Rev. roum. Biochim. *2*, 189 (1965).
6. Macovschi E., Mihăescu Angela, *Cantitatea şi concentraţia sucurilor provenite din frunze de varză încălzite la temperaturi diferite (Consideraţii în lumina teoriei biostructurii)*, St. cerc. biochim. (sub tipar).
7. Wagner B., *Tabellen zum Eintauchrefraktometer*, Sondershausen, 1907, p. VIII şi 46.

CONCENTRATION OF SAPS FROM ULTRAVIOLET IRRADIATED LEAVES (SOME CONSIDERATIONS IN THE LIGHT OF THE BIOSTRUCTURE THEORY)

SUMMARY

Ultraviolet irradiation of white and red cabbage, lettuce and spinach induces an increase in the refractive indices of saps expressed from these leaves at 300 atm; saps expressed from leaves after three hours of irradiation have a normal refractive index. These findings are interpreted in the light of the biostructure theory as a partial and reversible breakdown of leaf biostructure under the action of ultraviolet rays.

ST. CERC. BIOCHIM. 11, 4, 337–342 (1968)

CANTITATEA ŞI CONCENTRAŢIA SUCURILOR PROVENITE DIN FRUNZE DE VARZĂ ÎNCĂLZITE LA TEMPERATURI DIFERITE

CONSIDERAŢII ÎN LUMINA TEORIEI BIOSTRUCTURII

EUGEN MACOVSCHI şi ANGELA MIHĂESCU

Rezumat. — Cercetarea cantităţii de suc ce se obţine prin stoarcerea frunzelor de varză încălzite la temperaturi diferite, precum şi stabilirea cantităţii globale de substanţe dizolvate în acest suc au arătat că de la o anumită temperatură în sus atît cantitatea de suc, cît şi cantitatea de substanţe hidrosolubile cuprinse în el devin mult mai mari decît în cazul frunzelor neîncălzite. Acest rezultat a fost interpretat în sensul că la această temperatură (temperatura mortală minimă) se produce destrămarea biostructurii din protoplasma celulelor foliare. cu eliberarea atît a apei, cît şi a diferitelor substanţe hidrosolubile care au fost cuprinse în ea.

Se ştie că din frunze în prealabil omorîte prin încălzire la 100°C, tratare cu aer lichid, expunere la vapori de eter etc. se poate stoarce o cantitate de suc mult mai mare decît din frunze proaspete. Pentru explicarea acestui fapt au fost emise păreri diferite.

După Dixon şi Atkins [2], precum şi după Chibnall [1], sucul ce se stoarce atît din frunzele proaspete, cît şi din cele omorîte provine din lichidul vacuolar, iar cantitatea lui depinde de starea frunzelor, cele omorîte cedînd mai mult suc. Astfel, după părerea acestor autori, protoplasma nu participă la formarea sucului menţionat.

În schimb, Mason şi Phillis [6] consideră că numai sucul stors din frunzele proaspete provine din lichidul vacuolar (suc vacuolar), iar cel obţinut din frunzele omorîte constă nu numai din suc vacuolar, ci şi din suc provenit din descompunerea vitaidelor, adică a complexelor lipoproteice bogate în apă, aflate în citoplasmă (suc plasmatic).

O altă părere este susţinută de Medvedev [7], [8], după care sucul plasmatic nu rezultă din descompunerea unor compuşi, ci provine dintr-o soluţie preexistentă în protoplasmă, ca o fracţiune lichidă a acesteia.

În fine, conform concepţiei noastre [3], [4], o parte din materia protoplasmei este cuprinsă într-o structură cu totul specială, caracteristică viului şi numită biostructură, care rezistă la presiuni mari, dar se destramă o dată cu moartea, punînd în libertate apa şi alte substanţe din care este alcătuită[1]. Prin urmare, sucul obţinut prin stoarcerea frunzelor

[1] Fracţiunea apei celulare cuprinsă în biostructură se numeşte apa asimilată.

proaspete este suc vacuolar, iar cel obținut din frunzele omorîte este un suc mixt, format atît din sucul vacuolar provenit din lichidul vacuolar, cît și din sucul plasmatic provenit din lichidul rezultat din destrămarea biostructurii protoplasmei.

Eliberarea apei din biostructura materialului vegetal a fost cercetată prin omorîrea acestuia în diferite condiții experimentale [5]. Or, dacă biostructura se destramă o dată cu moartea și eliberează apa cuprinsă în ea, înseamnă că frunzele încălzite la temperaturi care nu le omoară ar urma să dea prin stoarcere numai sucul vacuolar, iar la temperaturi care le omoară o cantitate cu mult mai mare de suc mixt. Măsurînd deci cantitatea de suc ce se obține din frunze încălzite la temperaturi diferite, se poate afla temperatura minimă mortală pentru ele [5].

Este însă de așteptat ca în caz de destrămare biostructura să elibereze nu numai apa, ci și alte substanțe care intră în alcătuirea ei. Aceasta înseamnă că moartea frunzelor trebuie să fie însoțită de punerea în libertate a diferitelor substanțe provenite din biostructură, iar în cazul acesta ar trebui precizat dacă această eliberare începe sau nu la aceeași temperatură mortală minimă la care începe eliberarea apei.

Aceste probleme pot fi rezolvate prin examinarea sucurilor ce se obțin din materialul foliar. Cantitatea de substanțe eliberate din biostructură poate fi dedusă dacă se cunosc cantitățile și concentrațiile celor două sucuri, vacuolar și mixt, și este dată de diferența dintre cantitățile de substanțe cuprinse în aceste sucuri.

Pentru a afla deci comportarea biostructurii foliare la temperaturi ridicate, în vederea stabilirii temperaturii minime la care se destramă, și pentru a constata dacă destrămarea biostructurii duce la eliberarea nu numai a apei, ci și a substanțelor hidrosolubile, trebuie să determinăm cantitățile și concentrațiile sucurilor vacuolar și mixt ce se obțin din frunzele încălzite la temperaturi diferite.

MATERIAL ȘI METODA DE LUCRU

Cercetările le-am efectuat pe frunze de varză albă (*Brassica oleracaea* L. var. *capitata* D C.f. *alba*) și varză roșie (*Brassica oleracaea* L. var. *capitata* D C.f. *rubra*) scoase din căpățîni.

Frunzele, cît mai proaspete, se tăiau longitudinal de-a lungul nervurii principale (nervura se arunca); jumătățile din dreapta alcătuiau una din probe (probele *A*), iar jumătățile din stînga cealaltă probă (proba *B*). Dat fiind că frunzele odată desprinse de pe cotor își pierd relativ repede apa, imediat după recoltare ele erau introduse în pungi de material plastic, iar jumătățile tăiate se introduceau în alte pungi de plastic, unde se păstrau pînă la prelucrare, care și ea începea cît mai curînd cu putință.

Probele *A* erau probele martor; ele rămîneau la temperatura camerei și se storceau ca atare.

Probele *B* se introduceau în borcane cu dop rodat și se cufundau în baie marină, care se încălzea la temperaturi diferite: 40, 50, 60, 70, 80 și 100°C. Aici, probele *B* se menținеau timp de o oră la temperatura respectivă, apoi se răceau la temperatura camerei și se storceau. Astfel se obținea,

în funcție de împrejurări, fie numai sucul vacuolar — dacă frunzele rămîneau vii, fie sucul mixt — dacă frunzele erau omorîte.

Stoarcerea probelor se realiza cu o presă hidraulică manuală de laborator, tip Hafico, model 2 litri. Presiunea se ridica progresiv pînă la 300 atm și se menținea la această limită pînă cînd materialul înceta să mai dea suc (15 min erau în general de ajuns).

Cantitatea de suc obținut se măsura cu cilindrul gradat și se exprima în mililitri, iar concentrația lui globală se determina după centrifugare, prin măsurarea indicelui de refracție cu ajutorul unui refractometru Abbe, model Carl Zeiss Jena, și se exprima convențional în grame zaharoză la 100 ml suc, după tabelele lui Wagner [9]. Ținînd seama de volumul sucurilor obținute, se calcula apoi cantitatea totală, exprimată în zaharoză, de substanțe hidrosolubile conținute în ele.

REZULTATELE OBȚINUTE ȘI SEMNIFICAȚIA LOR

Unele rezultate obținute pe frunze de varză albă sînt trecute în tabela 1. Se constată că frunzele proaspete, nesupuse acțiunii temperaturilor ridicate, precum și cele încălzite la 40°C, dau o cantitate relativ mică de suc vacuolar care nu depășește 50 ml la 200 g frunze. Diferențele dintre probe se datoresc deosebirilor individuale și de umiditate a probelor din experiențe diferite.

Tabela 1

Volumul (ml), indicele de refracție(n) și concentrația, exprimată în zaharoză (g/100 ml), a sucurilor obținute prin toarcerea la 300 atm a probelor de cîte 200 g *frunze de varză albă*, neîncălzite (probele *A*) și încălzite timp de o oră a temperaturi diferite (probele *B*), precum și cantitatea totală de substanțe dizolvate în sucuri, exprimată în zaharoză (g)

Nr. crt.	Data 1967	Probele *A*				Probele *B*				
		volum (ml)	n	conc. în zaharoză g/100 ml	zaharoza totală g	t^0	volum (ml)	n	conc. în zaharoză g/100 ml	zaharoza totală g
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1.XI	36	1,3365	2,36	0,85	40	35	1,3390	4,11	1,44
2	1.XI	46	1,3355	1,62	0,75	50	52	1,3395	4,44	2,30
3	29.X	42	1,3365	2,36	0,99	60	62	1,3375	2,98	1,85
4	29.X	33	1,3365	2,36	0,78	70	154	1,3405	5,17	7,96
5	12.X	47	1,3360	1,98	0,93	80	136	1,3400	4,80	6,53
6	12.X	43	1,3360	1,98	0,85	100	147	1,3395	4,44	6,53

Volumele de suc ce se storc din frunzele încălzite la temperatura de 50 și 60°C depășesc 50 ml, dar sînt sub 70 ml (tabela 1, col. 8). Înseamnă că la aceste temperaturi biostructura eliberează o mică parte din apa asimilată, ceea ce face ca sucul obținut să nu poată fi considerat numai ca suc vacuolar. Fenomenul acesta reprezintă consecința unui efect excitant, pe care căldura îl exercită asupra biostructurii la temperaturi nu prea ridicate și care, probabil, este reversibil.

În fine, la temperaturi de la 70°C în sus se obțin cantități mari de suc, care depășesc 130 ml, semn că la această temperatură se produce

destrămarea biostructurii foliare cu eliberarea masivă a apei cuprinse în ea : Sucul astfel obținut este suc mixt.

Se poate deci admite, că pînă la 60°C inclusiv frunzele de varză albă rămîn vii, chiar dacă în preajma acestei temperaturi biostructura lor elimină o parte din apă, dar că temperaturile mai ridicate le omoară, provocînd destrămarea biostructurii și eliberarea unei cantități mari de apă asimilată.

O comportare similară față de temperaturi ridicate prezintă și frunzele de varză roșie (unele rezultate experimentale sînt prezentate în tabela 2), cu deosebire că atît cantitățile de suc vacuolar ce se obțin din frunzele neîncălzite și cele încălzite la 40°C, cît și cantitățile de suc mixt obținute din frunze omorîte la temperaturi de la 60°C în sus sînt mai mici decît cele ce se obțin din frunzele de varză albă în condiții similare.

Se mai constată că și la varza roșie se manifestă la 50°C un început de destrămare, probabil reversibilă, a biostructurii și că destrămarea profundă se produce la temperatură ceva mai joasă decît la varza albă, și anume la 60 în loc de 70°C. Se poate deci admite că, în condițiile cercetărilor noastre, frunzele de varză roșie rămîn vii chiar la temperaturi de 50°C, dar că temperatura de 60°C le omoară.

Toate acestea arată că stabilitatea biostructurilor diferitelor plante față de temperaturi ridicate depinde de natura plantelor.

Tabela 2

Volumul (ml), indicele de refracție (n) și concentrația exprimată în zaharoză (g/100 ml), a sucurilor obținute prin stoarcerea la 300 atm a probelor de cîte 200 g *frunze de varză roșie*, neîncălzite (probele *A*) și încălzite timp de o oră la temperaturi diferite (probele *B*), precum și cantitatea totală de substanțe dizolvate în sucuri, exprimată în zaharoză (g)

Nr. crt.	Data 1967	Probele *A*				Probele *B*				
		volum (ml)	*n*	conc. în zaharoză g/100 ml	zaharoza totală g	t^0	volum (ml)	*n*	conc. în zaharoză g/100 ml	zaharoza totală g
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	14.IX	18	1,3375	3,00	0,54	40	24	1,3365	2,36	0,57
2	12.IX	20	1,3380	3,38	0,67	50	46	1,3410	5,50	2,53
3	10.IX	27	1,3380	3,38	0,95	60	130	1,3430	6,90	8,97
4	8.IX	24	1,3370	2,70	0,65	70	135	1,3430	6,90	9,32
5	7.IX	22	1,3370	2,70	0,59	80	115	1,3420	6,23	7,17
6	16.IX	20	1,3370	2,70	0,54	100	121	1,3410	5,50	6,66

În privința concentrației sucurilor obținute și a cantității de substanțe hidrosolubile aflate în ele, indicii de refracție ne permit să tragem unele concluzii interesante. Într-adevăr, atît la frunzele de varză albă, cît și la cele de varză roșie indicii de refracție ai sucurilor vacuolare, obținute prin stoarcerea frunzelor proaspete, sînt mai mici decît ai sucurilor mixte, obținute din frunzele omorîte sub acțiunea temperaturilor mari. Prin urmare, concentrațiile sucurilor vacuolare sînt mai mici decît acelea ale sucurilor mixte. Dacă mai luăm în considerație și faptul că sucurile mixte se obțin în cantitate cu mult mai mare decît cele vacuolare, rezultă că proporția substanțelor hidrosolubile aflate în cele dintîi este incompa-

rabil mai mare decît la acestea din urmă. Aceasta înseamnă că moartea frunzelor este urmată de punerea în libertate a unei cantități relativ mari de substanțe hidrosolubile provenite din biostructură.

Compararea între ele a concentrațiilor sucurilor obținute din frunzele încălzite la temperaturi diferite, a cantităților de substanțe dizolvate în ele și a cantităților de suc eliberate la temperaturile respective (tabelele 1 și 2) arată că eliberarea substanțelor hidrosolubile din biostructura frunzelor se produce paralel cu eliberarea apei.

Este interesantă și constatarea că, la temperaturile apropiate de cele mortale minime (la 50 și 60°C pentru frunzele de varză albă și la 50°C pentru frunzele de varză roșie), alături de o oarecare cantitate de apă, biostructura eliberează și substanțe hidrosolubile. Semnificația posibilă a acestui fenomen a fost arătată mai sus.

CONCLUZII

Conform datelor experimentale prezentate în această lucrare, atît volumele cît și indicii de refracție ai sucurilor vacuolare obținute prin stoarcerea la 300 atm a frunzelor proaspete de varză albă și roșie neîncălzite, respectiv încălzite la 40°C, sînt mai mici decît ai sucurilor mixte obținute din frunzele omorîte la temperaturi ridicate. În preajma temperaturii mortale minime, cantitățile și chiar indicii de refracție ai sucurilor depășesc pe cei ai sucurilor vacuolare, dar rămîn inferiori celor ai sucurilor mixte.

Interpretarea acestor date în lumina teoriei biostructurii duce la concluzia că temperaturile ridicate provoacă destrămarea biostructurii și eliberarea unor cantități relativ mari de apă și substanțe hidrosolubile, că eliberarea atît a apei, cît și a substanțelor menționate începe simultan la aceeași temperatură, dependentă de natura plantei, și că la temperaturi ridicate, dar mai joase decît temperatura mortală minimă, biostructura elimină numai o parte din apa și substanțele hidrosolubile din care este alcătuită, probabil ca răspuns la acțiunea excitantă exercitată de căldură asupra ei.

Prezentată la redacție la 11 iunie 1968

Universitatea București,
Facultatea de biologie,
Catedra de biochimie

BIBLIOGRAFIE

1. Chibnall A. C., *A new method for the separate extraction of vacuole and protoplasmatic material from the leaf cells*, J. biol. Chem. *55*, 333 (1923).
2. Dixon H. H., Atkins W. G. R., *Osmotic pressures in plants*, Sci. Proc. Roy. Dub. Soc. *13*, 422 (1913).
3. Macovschi E., *Die lebende Materie und ihre Entstehung*, Rev. Chimie, *4*, 11 (1959).
4. Macovschi E., *Some problems of regulation mechanisms and of living matter structure*, Rev. roum. Biochim. *2*, 189 (1965).
5. Macovschi E., Marineanu I., *The structure theory, the state of protoplasm water and the problem of plant sap origin*, Rev. roum. Biochim. *4*, 235 (1967).
6. Mason T. G., Phillis E., *Experiments of the extraction of sap from the vacuole of the leaf of the cotton plant and their bearing on the osmotic theory of water absorption by the cell*, Ann. Bot. N.S. *3*, 531 (1939).

7. MEDVEDEV I. A., SEN TZIAN-SEA, *Nekotorye materialy po dinamike, lokalizatsii i obmena peptidov v listiah rastenii*, Biohimia, *24*, 709 (1959).
8. MEDVEDEV I. A., ZABOLOTSKII N. N., SEN TZIAN-SEA, MO SI-MU, DAVIDOVA E. G., DAVIDOV E. P., *Vydelenie ribonukleinovoi kisloty iz plazmennogo soka listiev rastenii i izuchenie osobennosti eio obmena*, Biohimia, *25*, 1001 (1960).
9. WAGNER B., *Tabellen zum Eintauchrefraktometer*, Sondershausen, 1907, p. VIII, 46.

AMOUNT AND CONCENTRATION OF SAPS FROM CABBAGE LEAVES HEATED AT DIFFERENT TEMPERATURES

(SOME CONSIDERATIONS IN THE LIGHT OF THE BIOSTRUCTURE THEORY)

SUMMARY

The investigation of sap amounts expressed from cabbage leaves heated at different temperatures as well as of total substance amounts dissolved in this sap has shown that above a certain temperature the amounts of both sap and water-soluble substances become much higher than in non-heated control leaves. This finding is considered as a breakdown of the biostructure in leaf cell protoplasm occurred at this temperature (minimum lethal temperature), accompanied by a release of water and of different water-soluble substances which were included in it.

ST. CERC. BIOCHIM. 11, 4, 343–347 (1968)

RESPIRAȚIA TISULARĂ HEPATICĂ LA ȘOBOLANII INTOXICAȚI PRIN TETRACLORURĂ DE CARBON

I. NIȚULESCU, GH. CHERA și L. RĂILEANU

Rezumat. — Nicotinatul de sodiu, injectat fie la șobolani sănătoși, fie la cei care au primit după 20 min. o doză toxică de CCl_4 (0,25 ml/100 g), stimulează deopotrivă consumul de oxigen, determinat *in vitro*, în omogenate hepatice, după 4 ore de la intoxicare, prevenind scăderea obișnuită a acestui consum pe care o provoacă CCl_4 singură.

Revenirea spre consumul normal e deopotrivă determinată și prin adăugare *in vitro*, la mediul de incubare, de glucoză, piruvat de sodiu, lactat de litiu, citrat de sodiu, alfa-cetoglutarat sau succinat de sodiu. Nicotinatul de sodiu administrat animalelor se comportă deci în același fel ca substratele adăugate *in vitro* omogenatului hepatic.

Aceste constatări sugerează că tulburările respiratorii hepatice, pe care unii autori (Christie și Judah, Dianzzani ș.a.) le pun pe socoteala pierderii fosfopiridin-nucleotidelor celulare, ar putea fi datorate și scăderii unor anumite substrate, a căror adăugare e capabilă să corecteze consumul de oxigen.

Apare deci că sistemul enzimelor rămîne activ în intoxicația cu CCl_4, cel puțin în primele 4 ore după intoxicare.

În cercetări anterioare [1], [6] am constatat că administrarea prealabilă, la șobolani, a acidului nicotinic, precursor important al fosfopiridin-nucleotidelor, reduce intensitatea leziunilor morfologice hepatice acute și proliferarea conjunctivă, provocată prin administrarea repetată a unor doze mici de tetraclorură de carbon.

Aceste observații par să vină în sprijinul teoriei formulate de Christie și Judah [2], susținută și de alți autori [4], [5], [7], care admit că leziunea biochimică primară, în intoxicația cu tetraclorură de carbon, constă în tulburarea proceselor de oxido-reducere hepato-celulare, cauzată prin pierderea fosfopiridin-nucleotidelor din mitocondriile lezate de toxic.

În continuarea cercetărilor ne-am propus să urmărim variațiile consumului de oxigen în omogenatul hepatic, după primele ore de la intoxicarea cu tetraclorură de carbon și după administrarea prealabilă de acid nicotinic sau după adăugarea la mediul de incubare a diferitelor substrate oxidabile.

METODA DE CERCETARE

Experiențele au fost urmărite pe două grupe de șobolani albi, de 150—200 g, care timp de 18 ore nu au primit nici o hrană.

Prima grupă a servit ca martor, iar a doua a fost destinată cercetărilor pe animale intoxicate cu o doză unică de tetraclorură de carbon (0,25 ml substanță pură la 100 g greutate), injectată în cavitatea peritoneală, cu 4 ore înainte de sacrificare.

Ambele grupe au fost compuse din cîte 9 loturi de 14 șobolani. În expunerea noastră, loturile primei grupe sînt notate cu litera *a*, iar acelea ale grupei a doua sînt notate cu litera *b*.

În cadrul fiecărei grupe au fost efectuate două serii de cercetări.

Prima serie a fost destinată cercetărilor pe animale neinjectate cu acid nicotinic. Consumul hepatic de oxigen a fost determinat fără adaos de substrat oxidabil (loturile *a*1 și *b*1) sau după adăugarea, în mediul de incubare, a glucozei, piruvatului de sodiu, lactatului de litiu, citratului de sodiu, alfa-cetoglutaratului sau succinatului de sodiu (loturile *a*2—*a*7 și *b*2—*b*7).

A doua serie de cercetări a urmărit variațiile consumului hepatic de oxigen la animalele injectate cu acid nicotinic, fără nici un adaos de substrat la mediul de incubare (loturile *a*8 și *b*8) sau după adaos de succinat de sodiu (loturile *a*9 și *b*9).

Acidul nicotinic a fost injectat subcutanat, în doză unică de 10 mg la 100 g greutate corporală, sub forma nicotinatului de sodiu (sol. 2%), cu o oră înainte de intoxicare sau cu 5 ore înainte de sacrificare, la șobolanii neintoxicați.

Consumul de oxigen a fost determinat cu ajutorul aparatului Warburg, introducînd în compartimentul principal al vasului de reacție : 1 ml omogenat hepatic (suspensie 10% în tampon fosfat, pH 7,4, preparată imediat după sacrificarea animalului), clorură de potasiu și clorură de magneziu pentru a ajunge la concentrații finale de $4{,}8 \cdot 10^{-3}$ M pentru tamponul fosfatic și $7{,}4 \cdot 10^{-2}$ M, respectiv $4{,}8 \cdot 10^{-4}$ M pentru ultimele două substanțe.

În vasele manometrelor, destinate determinării consumului de oxigen, în condițiile adăugării de substrate oxidabile, a fost introdusă în plus cîte una din substanțele amintite, în concentrații finale de $1 \cdot 10^{-2}$M pentru glucoză, piruvatul de sodiu, lactatul de litiu, citratul de sodiu și alfa-cetoglutarat, și de $1{,}5 \cdot 10^{-5}$M pentru succinatul de sodiu.

În cupa centrală a fost plasată hîrtie de filtru umezită cu 0,2 ml soluție de hidroxid de sodiu 10%.

Volumul final a fost de 3 ml. Consumul de oxigen a fost urmărit timp de 45 min de la începutul incubării, cu citiri la intervale de 15 min, în atmosferă de aer, la temperatura de 37°C, cu turație de agitare de 100/min.

Consumul de oxigen a fost exprimat în $mm^3/h/100$ mg țesut hepatic umed.

Tabela 1

Variațiile consumului de oxigen în omogenatul hepatic, exprimat în mm^3 O_2/h/100 mg țesut umed, la șobolani intoxicați sau nu cu CCl_4, în condițiile administrării acidului nicotinic sau ale adăugării de substrate oxidabile în mediul de incubare

Grupa de animale		Loturi *a* — neintoxicate			Loturi *b* — intoxicate		
Perioada de incubare		0—15 min	15—30 min	30—45 min	0—15 min	15—30 min	30—45 min
Lot	Substrat oxidabil adăugat	*Animale neinjectate cu acid nicotinic, după adăugare de substrat oxidabil*					
1	Fără adaos	48±4,6 —	44±2,6 —	40±2,7 —	44±1,4 (−9)	36±2,1 (−19)	28±2,6 (−30)
2	Glucoză	84±3,2 (+75)	56±1,4 (+27)	28±6,7 (−30)	76±2,4 (+72)	48±6,1 (+33)	32±3,4 (+14)
3	Piruvat de sodiu	76±2,8 (+58)	38±3,6 (−14)	36±4,2 (−10)	72±2,4 (+63)	36±2,2 (0)	36±5,6 (+28)
4	Lactat de litiu	104±4,5 (+116)	40±4,0 (−10)	56±7,1 (+40)	88±2,2 (+100)	44±2,3 (+22)	52±5,9 (+85)
5	Citrat de sodiu	112±3,8 (+133)	48±5,7 (+9)	12±6,9 (−70)	104±3,8 (+136)	48±4,3 (+33)	8±5,6 (−72)
6	α-Cetoglutarat de sodiu	104±2,7 (+116)	52±4,2 (+18)	36±5,0 (−10)	100±2,1 (+127)	28±1,0 (−22)	32±1.7 (+14)
7	Succinat de sodiu	504±12,7 (+950)	80±5,1 (+81)	64±4,8 (+60)	452±13,0 (+927)	44±5,0 (+22)	48±9,1 (+71)
		Animale injectate cu acid nicotinic					
8	Fără adaos	84±1,6 (+75)	48±3,6 (+9)	44±4,1 (+10)	96±3,8 (+118)	48±3,2 (+33)	52±5,5 (+85)
9	Succinat de sodiu	560±4,7 (+1066)	124±5,0 (+181)	48±2,3 (+20)	616±12,1 (+1300)	148±8,4 (+311)	64±7,0 (+128)

Notă: Valorile din paranteze reprezintă variațiile procentuale față de lotul I al grupei respective.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Analiza comparativă a rezultatelor obținute, prezentate în tabela 1, evidențiază următoarele :

Consumul de oxigen, fără adaos de substrat și fără administrare prealabilă de acid nicotinic, a apărut diminuat la animalele intoxicate. Scăderea a fost mai evidentă în perioadele 2 și 3 ale incubării (15—30 min și 30—45 min).

Injectarea acidului nicotinic a sporit consumul de oxigen atît la animalele neintoxicate, cît și, îndeosebi, la cele intoxicate, la ambele grupe în prima perioadă a incubării (0—15 min).

Decsi și colaboratori [3] au notat scăderea consumului de oxigen hepatic cu 40% față de martori, după 24 de ore de la intoxicarea șobolanilor.

Determinările efectuate în condițiile adăugării de substrate oxidabile la mediul de incubare au evidențiat stimularea respirației tisulare la animalele neinjectate cu acid nicotinic, atît la martori, cît și la șobolanii intoxicați. Sporul consumului de oxigen s-a evidențiat mai ales în prima perioadă a incubării, iar în perioada a doua el a diminuat foarte mult sau a încetat, constatîndu-se o revenire în perioada a treia numai pentru lactatul de litiu.

Singur succinatul de sodiu a continuat să stimuleze mai mult consumul de oxigen în perioadele 2 și 3 ale incubării.

La animalele injectate cu acid nicotinic, adăugarea succinatului de sodiu în mediul de incubare a sporit și mai mult consumul de oxigen, în raport cu creșterea provocată de administrarea singură a acestuia.

Prin urmare, acidul nicotinic injectat și substratele oxidabile adăugate la mediul standard au stimulat respirația tisulară în primele 15 min ale incubării, mărind consumul de oxigen atît la animalele sănătoase, cît și la cele intoxicate. Adaosul de succinat de sodiu în mediul de incubare al omogenatului de ficat, preparat de la șobolanii injectați cu acid nicotinic, a sporit și mai mult respirația, oglindită în creșterea consumului de oxigen.

Scăderea consumului de oxigen la nivelul ficatului, pe care noi am putut-o constata chiar în primele ore după intoxicare, s-ar putea datora fie alterării proceselor enzimatice în care sînt interesate fosfopiridin-nucleotidele, fie alterării substratelor asupra cărora își exercită acțiunea, fie ambelor acestor modalități.

Rezultatele noastre vin în sprijinul alterării unor substrate ale respirației celulare, deoarece enzimele respiratorii se dovedesc a rămîne active cînd e vorba de acțiunea lor asupra unor substrate adăugate *in vitro*, cel puțin 4 ore după intoxicare.

De aceea acceptăm ideea că tetraclorura de carbon își exercită acțiunea sa patogenă în primul rînd asupra substratelor oxidabile și, eventual, numai în al doilea rînd asupra însești enzimelor respiratorii.

Prezentată la redacție la 15 ianuarie 1968

Institutul de cercetări medicale al Academiei Republicii Socialiste România, Filiala Iași

BIBLIOGRAFIE

1. Chera Gh., Pojoga I., Ristescu Gh., Nițulescu I., vol. *Omagiu lui Ion Enescu*, Edit. Academiei, 1966, p. 195.
2. Christie G. S., Judah Y. D., Proc. roy. Soc. B., **142**, 241 (1954).
3. Decsi L., Méhes J., Varga F., Nutr. Abstr. Rev., **28**, *2*, 244 (1958).
4. Dianzzani M. U., Baccino F. M., Comporti M., Lab. Invest. U.S.A., **15**, *1*, 1, 149 (1966).
5. Gallagher C. H., Nature, **187**, 162 (1960).
6. Nițulescu I., Chera Gh., Pojoga I., Ristescu Gh., vol. *Omagiu lui Ion Enescu*, Edit. Academiei, 1966, p. 203.
7. Slater T. F., Sawyer B. C., Strauli U. D., Biochem. Pharmacol., **15**, 1273 (1966).

HEPATIC TISSUE RESPIRATION IN RATS INTOXICATED WITH CARBON TETRACHLORIDE

The sodium nicotinate, injected either to healthy rats or to those which received after 20 minutes a toxic dose of CCl_4 (0.25 ml/100 g), stimulates also the oxygen consumption, determined *in vitro* in hepatic homogenates, after 4 hours from intoxication, preventing the usual decrease of this consumption caused by CCl_4 itself.

The return to normal consumption is determined similarly by addition *in vitro*, in the incubation medium, of glucose, sodium pyruvate, lithium lactate, sodium citrate, alfa-cetoglutarate or sodium succinate. The sodium nicotinate, administered to animals, behaves in the same manner like the substrates added to hepatic homogenate *in vitro*.

These findings suggest that the hepatic respiration troubles, which, according to some authors (Christie and Judah, Dianzzani and others) would account for the cellular phosphopyridine-nucleotides loss, could be due also to the decrease of some substrates, the addition of which is able to correct the oxygen consumption.

Therefore it appears that the enzymatic system remains active in CCl_4 intoxication, at least during the first 4 hours after intoxication.

ST. CERC. BIOCHIM. **11**, *4*, 349–354 (1968)

RAPORTUL ANTIGENIC DINTRE PROTEINELE SOLUBILE DIN ENDOSPERMUL, SCUTELUL SEMINȚEI ȘI ALTE FORMAȚIUNI ȘI ORGANE ALE PORUMBULUI

VICTORIA ALEXANDRESCU

Rezumat. — Cu ajutorul serului imun antiproteină din endospermul plus scutelul semințelor de porumb (*Zea mays*) s-au pus în evidență 8 antigene în endosperm și 11 antigene în scutel. S-au decelat două antigene specifice endospermului care au grupări determinante asemănătoare și două pentru scutel. După 5—7 zile de la germinație, endospermul și scutelul conțin antigenele pe care le-au avut inițial în sămînță. Axul embrionar germinat conține șase antigene comune, iar frunza în etapa de plantă cu 4—5 frunze două antigene comune cu endospermul și scutelul seminței.

În lucrări anterioare am cercetat din punct de vedere imunochimic proteinele solubile din axul embrionar al seminței de porumb, înainte și după germinație, cu seruri imune omologe, și raportul antigenic cu alte formațiuni și organe ale porumbului [1], [2]. De asemenea, am analizat cu ajutorul unui ser imun omolog proteinele din scutelul și endospermul seminței de porumb, luate împreună [3].

În această lucrare am studiat separat proteinele din endospermul, respectiv scutelul seminței de porumb, cu ajutorul unui ser imun anti-endosperm plus scutel. Ne-am propus să stabilim antigenele specifice acestor două formațiuni, antigenele comune lor și pe cele comune cu axul embrionar al seminței de porumb. Pentru a cunoaște soarta antigenelor în procesul germinației, și anume dacă ele se metabolizează imediat sau se regăsesc și în cursul creșterii plantei, am urmărit capacitatea anticorpilor formați de a reacționa cu antigenele din cele trei formațiuni ale seminței, după 5 — 7 zile de la germinație, și cu cele ale frunzelor din etapa de plantă cu 4 — 5 frunze.

MATERIALE ȘI METODE

S-a lucrat cu semințe de porumb din soiul Dobrogean, varietatea *indurata*. Extracția proteinelor în vederea injectării lor la iepuri s-a făcut cu soluție tampon de acid succinic 0,013 M — hidroxid de sodiu 0,0224 M, pH = 8,6, în raportul 1 g făină la 3 ml soluție. Pentru cercetarea antigenelor comune s-a lucrat cu seruri absorbite cu preparate proteice ob-

ţinute prin metoda de mai sus, folosind însă cantităţi diferite de extractant : ax embrionar 1/15, scutel 1/8, endosperm 1/3 în cazul seminţei negerminate, ax embrionar 1/1, scutel 1/8 şi endosperm 1/3 după germinaţie, iar la frunze 1/1.

Imunoelectroforeza s-a efectuat după micrometoda Scheidegger [4], folosind tamponul de acid succinic 0,013 M — hidroxid de sodiu 0,0224 M, cu adaos de fosfat disodic M/60 vol/vol, pH final 8,4. Modul de lucru *in extenso* este dat în lucrările anterioare [1], [3].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Aspectul imunoelectroforegramei proteinelor solubile din *endospermul* seminţei de porumb, cu serul imun antiproteină din endosperm plus scutel, este redat în figura 1.

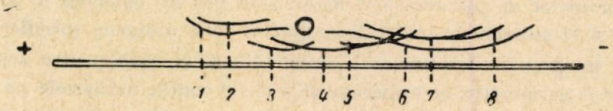


Fig. 1. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din endospermul seminţei de porumb cu serul imun antiproteină din endosperm plus scutel.

Se constată formarea a 8 linii de precipitare, pe care le-am notat de la 1 la 8. Din observaţiile noastre asupra modului de formare a liniilor reiese că liniile de precipitare 2 şi 6 adeseori se unesc, ceea ce arată că sînt date de antigene cu mobilităţi electroforetice diferite, dar cu grupări determinante asemănătoare.

Aspectul imunoelectroforegramei proteinelor solubile din *scutelul* seminţei de porumb, cu serul imun antiproteină din endosperm plus scutel, este redat în figura 2.

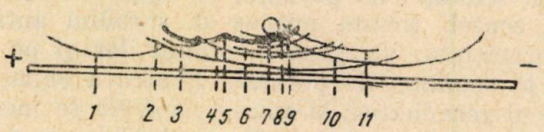


Fig. 2. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din scutelul seminţei de porumb cu serul imun antiproteină din endosperm plus scutel.

Se constată formarea a 11 linii de precipitare, repartizate în zona anodică şi în cea catodică a plăcii, notate de la 1 la 11. Se remarcă existenţa unor arcuri alungite, ceea ce arată fie prezenţa unor antigene identice, dar cu mobilităţi diferite, fie reţinerea parţială a antigenului de către gel, în timpul electroforezei. Liniile 5 şi 8 se unesc, demonstrînd că antigenele respective sînt asemănătoare, dar că moleculele lor au mobilităţi electroforetice diferite.

În lucrarea precedentă [3] am arătat că reacţia omologă dintre proteinele din endospermul luat împreună cu scutelul faţă de serul omolog

pune în evidență 13 linii de precipitare, pe cînd analiza lor separată evidențiază 19 linii de precipitare. Această deosebire se poate datora fie antigenelor comune acestor formațiuni, fie faptului că unele antigene erau în cantitate prea mică și astfel, în condițiile noastre, nu au putut fi sesizate prin formare de linii.

Pentru a găsi *antigenele comune* endospermului și scutelului, am lucrat cu antiser absorbit. În cazul absorbției antiserului cu proteină extrasă din scutel și analizat față de proteina din endosperm, se constată formarea a două linii de precipitare (liniile 2 și 6), ceea ce arată că numai aceste antigene nu există în scuteli, iar celelalte șase antigene sînt comune acestor două formațiuni (tabela 1).

Tabela 1

Raportul antigenic dintre proteinele solubile din endospermul **seminței de porumb și cele din scutel și axul embrionar (s-au notat cu semnul plus (+) antigenele din endosperm, precum și prezența antigenelor identice sau asemănătoare cu ele, din celelalte formațiuni cercetate)**

	Nr. antigenului	1	2	3	4	5	6	7	8
Formațiunea seminței	endosperm	+	+	+	+	+	+	+	+
	scutel	+		+	+	+		+	+
	ax embrionar			+	+			+	+

În cazul absorbției antiserului cu proteină extrasă din endosperm și analizat față de proteina din scuteli, se formează patru linii de precipitare, și anume: 4, 7, 9 și 11, în loc de 11 cîte prezintă martorul, ceea ce arată că antigenele care participă la formarea acestor linii de precipitare nu se găsesc în endosperm, pe cînd cele care formau celelalte 7 linii sînt comune acestor două formațiuni (tabela 2).

Tabela 2

Raportul antigenic dintre proteinele solubile din scutelul **seminței de porumb și cele din endosperm și axul embrionar (s-au notat cu semnul plus (+) antigenele din scutel, precum și prezența antigenelor identice sau asemănătoare cu ele, din celelalte formațiuni cercetate)**

	Nr. antigenului	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Formațiunea seminței	scutel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	endosperm	+	+	+		+	+		+		+	
	ax embrionar	+	+	+			+	+		+	+	

Această neconcordanță în numărul antigenelor comune endospermului și scutelului ne arată că, pe lîngă cele opt antigene evidențiate de noi, endospermul mai conține încă unul, care însă este într-o cantitate sub limita de sensibilitate a metodei imunoelectroforetice. Acest antigen se găsește însă în cantitate suficientă în scutel, s-a putut identifica imunoelectroforetic și poate fi precipitat prin absorbția antiserului cu proteine din endosperm.

Pentru a stabili *antigenele specifice* de formațiune, a trebuit să vedem dacă există antigene comune între endosperm și axul embrionar și între scutel și axul embrionar.

Absorbția antiserului cu proteină din axul embrionar și compararea lui cu proteinele din endosperm duc la formarea liniilor de precipitare 1, 2, 5 și 6. Deci, antigenele care participă la formarea celorlalte patru linii de precipitare sînt comune acestor formațiuni.

Analiza imunoelectroforetică a antiserului absorbit de mai sus, față de proteinele extrase din scutel, pune în evidență formarea a patru linii de precipitare, și anume : 4, 5, 8 și 11 ceea ce arată că restul antigenelor sînt comune scutelului și axului embrionar.

Din tabela 1 se poate vedea că antigenele care participă la formarea liniilor 2 și 6 nu se găsesc nici în scutel, nici în axul embrionar și deci sînt specifice endospermului. După cum am arătat mai sus, liniile 2 și 6 sînt date de antigene cu grupări determinante asemănătoare, dar care posedă mobilități diferite. Celelalte antigene se mai găsesc fie și în scutel (1 și 5), fie atît în axul embrionar, cît și în scutel (3, 4, 7 și 8).

Din tabela 2 reiese că antigenele care participă la formarea liniilor 4 și 11 se găsesc doar în scutel și deci sînt specifice acestei formațiuni, pe cînd celelalte mai există fie în endosperm (5 și 8), fie în axul embrionar (7 și 9), fie în ambele formațiuni (1, 2, 3, 6 și 10).

Se știe că în procesul *germinației* are loc hidroliza proteinelor de rezervă ale seminței, pentru ca aminoacizii rezultați să fie transportați în formațiunile ce cresc. Problema dacă are loc concomitent și o sinteză nouă de proteine este viu discutată. Unele lucrări arată formarea enzimelor [5] sau a proteinelor în general [6] la nivelul formațiunilor de rezervă, în cursul germinației, iar altele consideră că această creștere a activității enzimatice poate fi datorată unei activări sau deblocări a proteinelor preexistente în sămînță [7].

În acest sens ni s-a părut interesant să urmărim capacitatea anticorpilor formați în antiserul nostru de a reacționa cu antigenele din formațiunile seminței după o perioadă de 5 — 7 zile de la germinație și chiar în plantă, și anume ne-am oprit la frunze din etapa de plantă cu 4 — 5 frunze. Am ales faza de 5 — 7 zile de la germinație, deoarece cercetări anterioare ne-au arătat o separare electroforetică a proteinelor din axul embrionar, net deosebită față de cea a proteinelor din formațiunile seminței [8] sau din frunze [9].

Fig. 3. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din endosperm după 5— 7 zile de la germinația seminței cu serul imun antiproteină din endosperm plus scutel.

Prin metoda folosită de noi nu ne putem da seama de structura proteinelor, ci de faptul dacă antigenele existente în formațiunile seminței germinate sau în frunze au grupări determinante identice sau asemănătoare cu cele ale antigenelor din endosperm plus scutel.

Analiza imunoelectroforetică a proteinei din endosperm după germinația semințelor și antiserul nostru pune în evidență formarea a opt linii de precipitare (fig. 3).

Analiza imunoelectroforetică dintre proteinele scutelului seminței după germinație cu antiserul nostru ne arată prezența a 11 linii de precipitare, însă toate sînt de intensitate slabă (fig. 4).

Fig. 4. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din scutel după 5—7 zile de la germinația seminței cu serul imun antiproteină din endosperm plus scutel.

Absorbția antiserului nostru cu proteină din endospermul luat împreună cu scutelul semințelor germinate și analizarea lui față de proteină din endospermul luat împreună cu scutelul semințelor negerminate ne-au arătat că avem de-a face cu o precipitare totală a anticorpilor. Aceasta ne arată că aceste două formațiuni luate împreună conțin antigenele inițiale și după 5 — 7 zile de la începerea germinației.

Analiza imunoelectroforetică dintre proteinele axului embrionar după germinația seminței și antiserul nostru pune în evidență șase linii de precipitare (fig. 5).

Fig. 5. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din axul embrionar germinat cu serul imun antiproteină din endosperm plus scutel.

Urmărirea capacității antiserului nostru de a reacționa cu proteinele *frunzei* a pus în evidență la analiza imunoelectroforetică directă două linii de precipitare (fig. 6), una în dreptul startului și a doua spre anod.

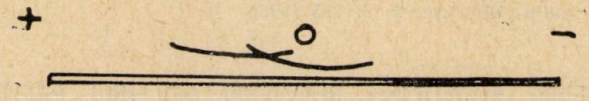


Fig. 6. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din frunză în etapa de plantă cu 4—5 frunze cu serul imun antiproteină din endosperm plus scutel.

CONCLUZII

Cercetările efectuate cu ajutorul serului imun antiproteină din endospermul luat împreună cu scutelul seminței de porumb ne-au dus la următoarele rezultate :

a) S-a pus în evidență existența a opt antigene în endosperm și 11 antigene în scutel; pe cale indirectă s-a relevat și al nouălea antigen în endosperm.

b) S-au decelat două antigene specifice pentru endosperm, care au grupări determinante asemănătoare și două pentru scutel.

c) Celelalte antigene sînt fie comune celor trei formaţiuni (endosperm, scutel, ax embrionar), fie numai între două formaţiuni.

d) După 5 — 7 zile de la germinaţia seminţei, endospermul şi scutelul conţin încă toate antigenele pe care le-au avut iniţial în sămînţă.

e) Axul embrionar germinat conţine şase antigene comune cu endospermul şi scutelul seminţei de porumb.

f) Frunza în etapa de plantă cu 4 — 5 frunze conţine două antigene comune cu endospermul şi scutelul seminţei.

Prezentată la redacţie la 16 decembrie 1967

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. V. Alexandrescu, *Raportul antigenic dintre proteinele solubile din axul embrionar al seminţei şi alte formaţiuni şi organe ale porumbului*, St. cerc. biochim. **11**, *3* (1968).
2. V. Alexandrescu, I. Călin, *Comportarea electroforetică şi imunoelectroforetică a proteinelor din axul embrionar al seminţei de porumb după germinaţie*, St. cerc. biochim. **11**, *3* (1968).
3. V. Alexandrescu, *Comportarea electroforetică şi imunoelectroforetică a proteinelor solubile din germenii şi endospermii de porumb*, St. cerc. biochim. **10**, 4, 301 (1967).
4. J. J. Scheidegger, *Une micro-méthode de l'immunoélectrophorese*, Int. Arch. Allergy **7**, 103 (1955).
5. J. E. Varner, L. V. Balce, *Senescence of cotyledons of germinating peas. Influence of axis tissue*, Plant Phisiol. **38**, 89 (1963).
6. A. Marcus, J. Feeley, *Protein synthesis in imbibed seeds. II. Polysome formation during imbibition*, J. biol. Chem. **240**, 1675 (1965).
7. A. Marcus, J. Velasco, *Enzymes of the glyoxylate cycle in germinating peanuts and castor deans*, J. biol. Chem. **235**, 563 (1960).
8. V. Alexandrescu, *Localizarea activităţii amilazei şi invertazei pe fracţiunile proteice solubile din seminţele de porumb în timpul încolţirii*, St. cerc. biochim. **5**, *3*, 399 (1962).
9. V. Alexandrescu, *Comportement électrophorétique des protéines solubles des feuilles de mais*, Rev. roum. Biochim. **2**, *2*, 115 (1965).

THE ANTIGENIC RELATIONS BETWEEN SOLUBLE PROTEINS FROM THE ENDOSPERM, SEED SCUTEL AND OTHER PARTS AND ORGANS OF THE MAIZE

SUMMARY

By means of antiprotein immune serum from the endosperm in addition to the scutel of the seeds of maize (*Zea mays*), 8 antigens in the endosperm and 11 antigens in the scutel were made evident. Two antigens specific to the endosperm which have similar determining groups, and two for the scutel were determined. After 5—7 days from the germination, the endosperm and scutel contain the antigens which they have had at the beginning in the seed. The germinated embryonal axis contains six common antigens while the leaf in the stage of a plant with 4—5 leaves, contains 2 antigens common with the endosperm and the scutel of seed.

ST. CERC. BIOCHIM. 11, 4, 355–362 (1968)

ELECTROFOREZA ŞI IMUNOELECTROFOREZA PROTEINELOR DIN ENDOSPERMUL ŞI SCUTELUL SEMINŢEI GERMINATE ŞI RAPORTURILE ANTIGENICE CU ALTE FORMAŢIUNI ŞI ORGANE ALE PORUMBULUI

VICTORIA ALEXANDRESCU şi IOANA CĂLIN

Rezumat. — Proteinele solubile din endospermul seminţei de porumb germinate se separă prin electroforeza în gel de agar în şapte fracţiuni, iar cele din scutel în zece fracţiuni.

Cu ajutorul serului imun antiproteină din endosperm plus scutelul seminţei de porumb (*Zea mays*), după 5–7 zile de la germinaţie, s-au pus în evidenţă 11 antigene în endosperm şi 15 antigene în scutel. Endospermul conţine aceleaşi antigene ca şi înainte de germinaţie, pe cînd scutelul conţine 4 antigene noi. Frunza, în etapa de plantă cu 4–5 frunze, conţine două antigene comune cu endospermul şi scutelul seminţei germinate.

Nu s-au putut pune în evidenţă prin absorbţia încrucişată a antiserurilor diferenţe calitative între soiurile, respectiv varietăţile cercetate.

Lucrarea de faţă este continuarea cercetărilor privind caracterizarea proteinelor din formaţiunile seminţei de porumb, în repaus şi după germinaţie, prin analiza electroforetică şi imunoelectroforetică în gel de agar [1], [2], [3], [4].

În această lucrare s-au caracterizat proteinele solubile din endospermul şi scutelul seminţei de porumb, după 5 — 7 zile de la începerea germinaţiei, prin electroforeza în gel de agar şi imunoelectroforetic. Ni s-a părut interesant să urmărim proteinele în timpul germinaţiei, cu ajutorul unui ser imun antiproteină din endosperm plus scutel după 5 — 7 zile de la germinaţie, cu atît mai mult cu cît lucrări de acest gen nu am găsit în literatură. Cu ajutorul acestui ser s-au putut urmări antigenele existente în această perioadă cînd problema sintezei de proteină nouă este mult discutată, pentru a face o comparaţie cu rezultatele obţinute pentru sămînţă [4]. S-a urmărit capacitatea antiserului obţinut de a reacţiona cu antigenele din sămînţă, din axul embrionar după 5 — 7 zile de la germinaţie şi din frunză, în etapa de plantă cu 4 — 5 frunze, pentru a vedea evoluţia lor în cursul proceselor morfogenetice prin care trece planta.

De asemenea, s-a urmărit compararea acestor caractere la proteine extrase din seminţe care fac parte din varietăţi diferite, pentru a vedea dacă putem sesiza în această etapă de creştere antigene specifice de varietate.

MATERIALE ŞI METODE

S-a lucrat pe seminţe de porumb românesc de Studina, din varietatea *indurata*, şi ICAR-54, din varietatea *indentata*. Seminţele s-au pus la germinat în apă de robinet care conţinea $1^0/_{00}$ formol, în cutii Petri, la întuneric, la temperatura camerei. Cînd mugurașul a ajuns de 2 — 6 cm lungime, s-a separat endospermul plus scutelul. Endospermii plus scutelii obţinuţi după germinaţia seminţei s-au lăsat să se usuce la temperatura camerei şi s-au măcinat, iar din făina astfel obţinută s-au extras proteinele solubile care s-au injectat la iepuri pentru obţinerea antiserului.

Extragerea proteinelor solubile din endospermul luat împreună cu scutelul s-a făcut în soluţie tampon de acid succinic 0,013 M — hidroxid de sodiu 0,0224 M, pH = 8,6, raportul de extracţie fiind de 1 g material/3 ml extract. S-a agitat o oră la temperatura camerei sau s-a lăsat 16 ore la frigider. S-a centrifugat, supernatantul s-a extras pentru îndepărtarea lipidelor cu butanol (1—2 volume faţă de extract), s-a dializat faţă de apă distilată şi apoi s-a concentrat în curent de aer şi s-a folosit imediat pentru injectare. Într-o lucrare anterioară am constatat că se formează aceiaşi anticorpi, fie că materialul injectat a fost liofilizat, fie că a fost concentrat în curent de aer [1].

Pentru electroforeză şi imunoelectroforeză s-au obţinut preparate proteice liofilizate prin aceeaşi metodă, folosind doar cantităţi de extractant în raporturi diferite: ax embrionar 1/15, scutel 1/8, endosperm 1/3 în cazul seminţei; ax embrionar 1/1, scutel 1/8 şi endosperm 1/3 după germinaţia seminţei, iar pentru frunză 1/1.

Imunizarea s-a făcut cu aproximativ 150 mg proteină/animal, fracţionată în 7 — 8 doze crescînde la interval de 5 — 7 zile, folosind ca adjuvant hidroxidul de aluminiu. S-a lucrat pe cîte trei iepuri pentru fiecare din cele două soiuri de porumb. Titrul precipitant a fost de 1,8 μg/ml antigen.

Electroforeza în gel de agar şi imunoelectroforeza s-au efectuat după micrometoda Scheidegger [5], folosind ca tampon acid succinic 0,013 M — hidroxid de sodiu 0,0224 M cu adaos de fosfat disodic M/60 vol/vol, pH final = 8,4, gelul de agar fiind făcut în acelaşi tampon diluat 1 :2 cu apă distilată.

S-au făcut imunoelectroforeze de control şi s-a constatat că serul sanguin de iepure nu dă linii de precipitare cu antigenele din scutelul sau endospermul seminţei de porumb după 5 — 7 zile de la germinaţie.

Pentru cercetarea antigenelor comune între aceste formaţiuni după germinaţie şi aceleaşi formaţiuni înainte de germinaţie sau din alte organe s-a lucrat cu seruri absorbite [2].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Electroforeza în gel de agar. În condițiile noastre de lucru, proteinele solubile din endospermul seminței de porumb germinate s-au separat în 7 fracțiuni, din care 3 repartizate în regiunea anodică și 4 în regiunea catodică a plăcii de agar (fig. 1).

Valorile mobilităților electroforetice ale acestor fracțiuni sînt cuprinse între $2,7 \cdot 10^{-5}$ și $0,24 \cdot 10^{-5}$ $cm^2/s/V$, după cum se vede din tabela 1.

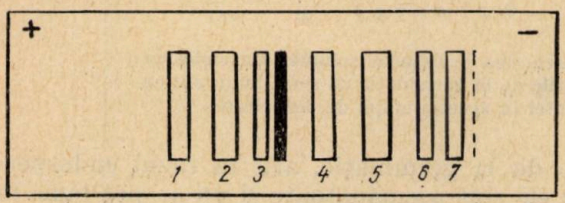


Fig. 1. — Electroforegrama în gel de agar a proteinelor solubile din endospermul seminței de porumb după 5—7 zile de la germinație.

Tabela 1

Mobilitatea fracțiunilor proteice din endospermul seminței de porumb germinate (x = valoarea dată în tabelă)

Nr. fracțiunii proteice	Mobilitatea $x \cdot 10^{-5}$ $cm^2/s/V$
1	2,70
2	2,32
3	1,98
4	1,42
5	0,93
6	0,48
7	0,24

Proteinele solubile din scutelul seminței de porumb germinate s-au separate în 10 fracțiuni, din care 5 repartizate în regiunea anodică și 5 în regiunea catodică a plăcii de agar (fig. 2).

Valorile mobilităților electroforetice ale acestor fracțiuni proteice sînt cuprinse între $3,78 . 10^{-5}$ și $0,38 . 10^{-5}$ $cm^2/s/V$, după cum se vede din tabela 2.

Urmărirea în paralel a migrării amidonului alături de proteina noastră a arătat în ambele cazuri că la sfîrșitul timpului de migrare amidonul se găsește dincolo de ultima fracțiune proteică. În figurile 1 și 2 am reprezentat printr-o linie punctată locul unde a ajuns amidonul (punct zero de migrare) și se constată că la endosperm fracțiunea a 7-a se găsește chiar lîngă această linie. Aceasta arată că proteinele din extrac-

Tabela 2

Mobilitatea fracțiunilor proteice din scutelul seminței de porumb germinate (x = valoarea dată în tabelă)

Nr. fracțiunii proteice	Mobilitatea $x \cdot 10^{-5}$ $cm^2/s/V$
1	3,78
2	3,19
3	2,57
4	2,36
5	2,22
6	1,56
7	1,14
8	0,90
9	0,65
10	0,38

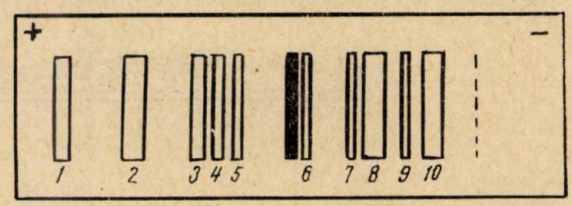


Fig. 2. — Electroforegrama în gel de agar a proteinelor solubile din scutelul seminței de porumb după 5—7 zile de la germinație.

tele noastre sînt încărcate electronegativ, dar din cauza curentului de electroendosmoză o parte din ele se repartizează în regiunea catodică.

Din lucrarea anterioară [1], unde s-a redat separarea electroforetică a proteinelor din aceste două formațiuni luate împreună, se constată că cele 14 fracțiuni proteice aveau mobilitatea electroforetică cuprinsă între

$2{,}12 \cdot 10^{-5}$ şi $0{,}04 \cdot 10^{-5}$ $cm^2/s/V$. Aceasta arată că germinaţia duce la creşterea mobilităţii electroforetice a unor fracţiuni proteice şi la micşorarea numărului lor.

Comparînd electroforegramele obţinute cu extractele proteinelor din cele două soiuri de porumb care fac parte din varietăţi diferite, s-a

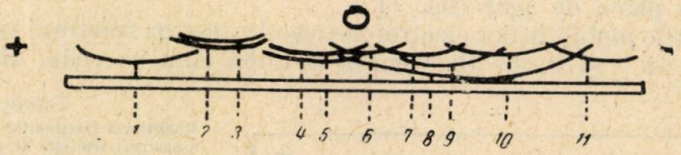


Fig. 3. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din endospermul seminţei după 5—7 zile de la germinaţie cu serul imun antiendosperm plus scutel în aceeaşi etapă de dezvoltare.

constatat că după 5 — 7 zile de la germinaţie, atît în cazul endospermilor, cît şi în cazul scutelilor ele sînt asemănătoare şi nu se pot pune în evidenţă diferenţe în ceea ce priveşte mobilitatea lor electroforetică.

Imunoelectroforeza. Aspectul imunoelectroforegramei proteinelor solubile din *endosperm* cu serul imun antiproteină din endosperm plus scutel, după germinaţia seminţelor, este redat în figura 3.

Se constată formarea a 11 linii de precipitare, repartizate în zona anodică şi în cea catodică a plăcii, notate de la 1 la 11.

Aspectul imunoelectroforegramei proteinelor extrase din *scutel* după germinaţia seminţei, cu acelaşi antiser, este redat în figura 4.

Se constată formarea a 15 linii de precipitare, repartizate în zona anodică şi în cea catodică a plăcii şi notate de la 1 la 15.

Pentru a cerceta identitatea sau diferenţierea care există între antigenele din endospermii luaţi împreună cu scutelii celor două soiuri de porumb cercetate, am lucrat cu seruri absorbite. Antiserul astfel prelucrat nu mai dă linii de precipitare la reacţia omologă. Astfel, nu s-au putut pune în evidenţă antigene caracteristice de varietate.

Pentru a vedea dacă în această etapă de creştere există antigene specifice de formaţiune, am stabilit mai întîi antigenele comune între endosperm şi scutel şi apoi între aceste formaţiuni şi axul embrionar.

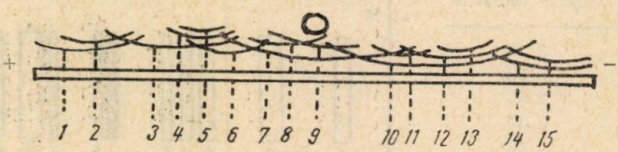


Fig. 4. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din scutelul seminţei după 5—7 zile de la germinaţie cu serul imun antiendosperm plus scutel în aceeaşi etapă de dezvoltare.

Pentru a găsi în extractul proteic obţinut de noi antigenele comune endospermului şi scutelului, am lucrat cu antiser absorbit cu proteină extrasă din scutel şi analizat faţă de proteina din endosperm şi, invers, cu antiser absorbit cu proteină extrasă din endosperm şi analizat faţă de proteina din scutel.

Tabela 3

Raportul antigenic dintre proteinele solubile din endospermul seminței de porumb germinate și cele din scutel și axul embrionar (s-au notat cu semnul plus (+) antigenele din endosperm, precum și prezența antigenelor identice sau asemănătoare cu ele, din celelalte formațiuni cercetate)

Nr. antigenului	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Endosperm	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Scutel	+	+		+	+	+		+	+	+	+
Ax embrionar		+		+				+	+	+	+

Tabela 4

Raportul antigenic dintre proteinele solubile din scutelul seminței de porumb germinate și cele din endosperm și axul embrionar (s-au notat cu semnul plus (+) antigenele din scutel, precum și prezența antigenelor identice sau asemănătoare cu ele, din celelalte formațiuni cercetate)

Nr. antigenului	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Scutel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Endosperm	+		+	+	+				+	+	+		+		+
Ax embrionar		+		+	+	+	+		+	+			+	+	+

În primul caz se constată formarea numai a două linii de precipitare în loc de 11, și anume 3 și 7; deci celelalte linii de precipitare se formau cu antigene care se găsesc și în scutel (tabela 3). În cazul al doilea se formează 6 linii de precipitare în loc de 15, și anume 2, 6, 7, 8, 12 și 14, ceea ce arată că antigenele care participă la formarea celorlalte linii de precipitare sînt comune endospermului și scutelului. Aceasta arată că cele două formațiuni au nouă antigene comune (tabela 4).

Pentru stabilirea antigenelor comune cu axul embrionar germinat am absorbit antiserul cu preparatul proteic respectiv și l-am analizat față de proteina extrasă din endosperm, respectiv scutel, după germinația seminței.

În primul caz s-au format cinci linii de precipitare, și anume 1, 3, 5, 6 și 7, ceea ce arată că restul de șase antigene se găsesc și în axul embrionar germinat.

În cazul al doilea s-au format cinci linii de precipitare, și anume 1, 3, 8, 11 și 12; restul antigenelor care formau celelalte 10 linii sînt comune scutelului și axului embrionar în această etapă de creștere.

Din analiza acestor date (tabela 3) reiese că, în cazul endospermului, două din cele 11 linii de precipitare puse în evidență cu ajutorul antiserului nostru sînt date de antigene care se găsesc numai în endosperm și sînt specifice formațiunii (liniile 3 și 7), trei sînt date de antigenele comune endospermului și scutelului (liniile 1, 5 și 6), iar șase sînt date de antigenele comune tuturor acestor trei formațiuni.

În cazul scutelului (tabela 4), din cele 15 linii de precipitare evidențiate de noi, două sînt date de antigenele care se găsesc numai în scutel, antigene specifice formațiunii (liniile 8 și 12), trei de antigenele comune între scutel și endosperm (liniile 1, 3 și 11), patru de antigenele comune între scutel și axul embrionar (liniile 2, 6, 7 și 14) și șase de antigene

care se găsesc în toate aceste trei formaţiuni în această etapă de creştere.

În lucrarea privind antigenele din aceste formaţiuni ale seminţei în stadiu de repaus [4] am arătat că endospermul luat împreună cu scutelul mai conţine încă toate antigenele şi după această perioadă de germinaţie.

În studiul endospermului şi scutelului seminţei de porumb [4] am pus în evidenţă 8 antigene în endosperm şi 11 în scutel. Cu ajutorul antiserului obţinut cu proteină din aceste formaţiuni, după 5 — 7 zile de la începerea germinaţiei, s-au evidenţiat 11 antigene în endosperm şi 15 în scutel.

Pentru a stabili dacă avem de-a face cu o sinteză de antigene noi sau cu antigene care există şi în sămînţă, dar cu un mai bun răspuns al animalelor în cazul de faţă, am efectuat analiza imunoelectroforetică directă a proteinelor din endosperm cu ambele antiseruri.

Se constată că proteinele din endospermul seminţei în repaus pun în evidenţă 11 linii de precipitare cu serul antiendosperm plus scutel după germinaţia seminţei şi 8 linii cu serul omolog (fig. 5 (*I*)). După 5 — 7 zile de la germinaţie, proteinele din endospermul seminţei pun în evidenţă 8 linii de precipitare cu serul imun antiendosperm plus scutelul seminţei şi 11 linii cu serul omolog (fig. 5 (*II*)).

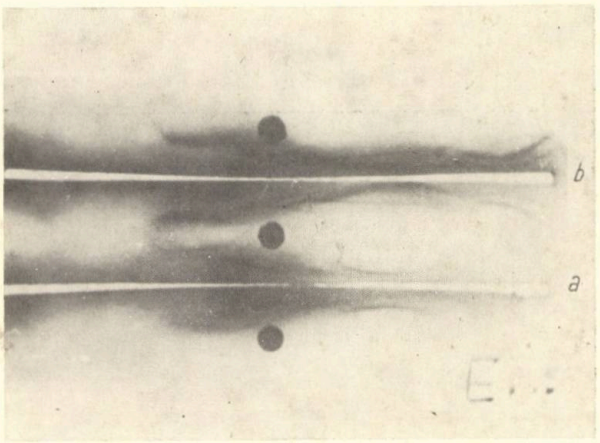
Aceste date arată că diferenţa dintre antiseruri este datorată faptului că noi am obţinut o reacţie slabă a animalelor faţă de proteinele din endospermul seminţei; confirmă însă că după 5 — 7 zile de la germinaţie endospermul mai conţine încă toate antigenele.

În lucrarea anterioară, antigenele din scutelul seminţelor au dus la obţinerea unui antiser care a determinat apariţia a 11 linii de precipitare, pe cînd în cazul de faţă, după germinaţie, se obţin 15 linii de precipitare.

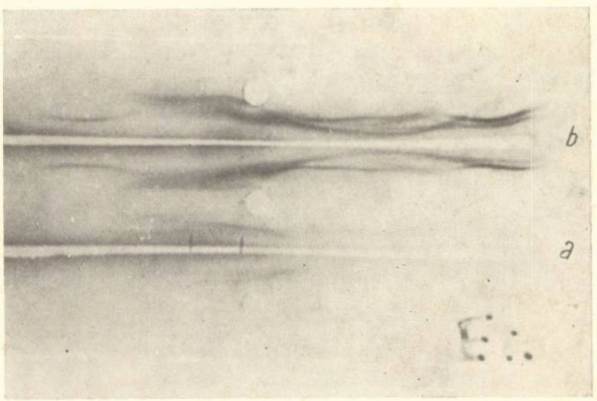
Pentru a vedea dacă şi în acest caz avem de-a face cu o reacţie slabă a animalelor la antigenele care se găsesc în scutelul seminţei, sau cu o sinteză de antigene noi, am efectuat imunoelectroforeza proteinelor din scutelul seminţei de porumb, în paralel, faţă de ambele antiseruri. Proteina din scutelul seminţei formează 11 linii de precipitare cu ambele seruri imune (fig. 6 (*I*)), iar proteina din scutelul seminţei, după 5—7 zile de la germinaţie, formează 11 linii cu serul antiendosperm plus scutelul seminţei şi 15 linii cu serul antiendosperm plus scutel după germinaţia seminţei (fig. 6 (*II*)).

Această constatare s-a verificat şi prin absorbţia serului antiendosperm plus scutel după germinaţia seminţei, cu proteină din scutelul seminţei. Analiza imunoelectroforetică a acestui ser absorbit, faţă de proteina extrasă din scutel după germinaţia seminţei, a pus în evidenţă formarea a patru linii de precipitare, şi anume 1, 7, 8 şi 12, care sînt deci date de antigene ce nu se găsesc în scutelul seminţei. Cele două antigene care se găsesc numai în scutel (liniile 8 şi 12) sînt deci sintetizate în timpul germinaţiei.

În continuare am urmărit dacă antigenele puse în evidenţă în endosperm şi scutel, după germinaţie, mai pot fi găsite şi într-o etapă ulterioară de dezvoltare a porumbului, şi anume în *frunze*. Pentru aceasta am analizat capacitatea proteinelor extrase din frunze, în etapa de plantă

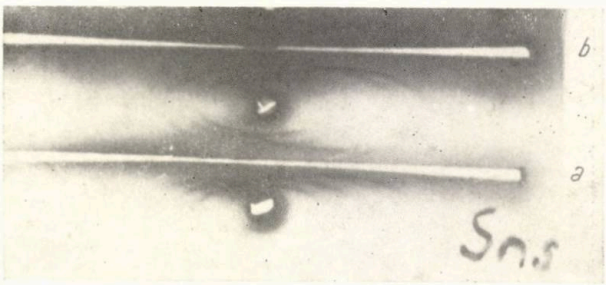


I

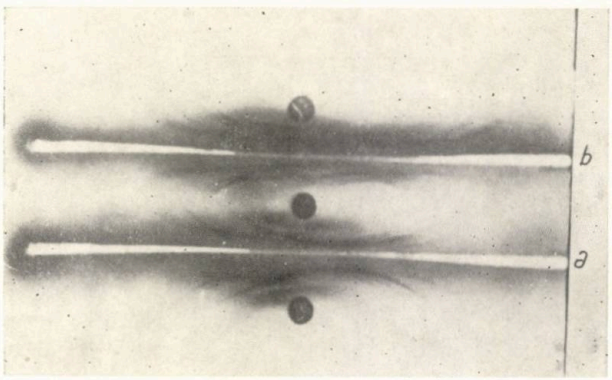


II

Fig. 5. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din endospermul seminței în repaus (*I*) și după 5—7 zile de la germinație (*II*) cu serurile imune : *a*—antiendosperm plus scutelul seminței ; *b* — antiendosperm plus scutelul seminței germinate.



I



II

Fig. 6. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din scutelul seminței în repaus (*I*) și după 5—7 zile de la germinație (*II*) cu serurile imune: *a* — antiendosperm plus scutelul seminței; *b* — antiendosperm plus scutelul seminței germinate.

cu 4 — 5 frunze, de a reacționa cu anticorpii din antiserul nostru. Se constată formarea a două linii de precipitare (fig. 7), atît la analiza imunoelectroforetică, cît și prin dubla difuzie după Ouchterlony, arătînd prezența de antigene comune. De altfel, într-o lucrare anterioară [4] am obținut

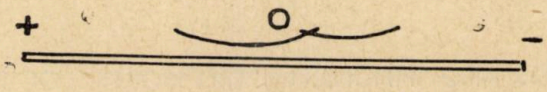


Fig. 7. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din frunză cu serul imun antiendosperm plus scutel după 5—7 zile de la germinație.

tot două antigene comune între proteinele din frunză și cele din endospermul plus scutelul seminței în repaus.

CONCLUZII

a) Proteinele solubile din endospermul seminței de porumb germinate se separă prin electroforeza în gel de agar în 7 fracțiuni, iar cele din scutel în 10 fracțiuni.

b) Procesul germinației duce la micșorarea numărului de fracțiuni proteice și la apariția unor proteine cu mobilități electroforetice mai mari.

c) S-au pus în evidență 11 antigene în endosperm și 15 antigene în scutelul seminței de porumb, după 5—7 zile de la germinație.

d) Endospermul, după 5 — 7 zile de la germinația seminței, conține aceleași antigene pe care le-a avut și înainte de germinație.

e) Scutelul, după 5 — 7 zile de la germinația seminței, conține 4 antigene noi în plus față de scutelul seminței negerminate.

f) Frunza, în etapa de plantă cu 4 — 5 frunze, conține două antigene comune cu endospermul luat împreună cu scutelul seminței germinate.

g) Prin electroforeza și absorbția încrucișată a antiserurilor nu s-au putut pune în evidență diferențe calitative între varietățile de porumb cercetate în cazul proteinelor solubile din endospermul și scutelul seminței de porumb după 5 — 7 zile de la germinație.

Prezentată la redacție la 16 decembrie 1967

Institutul de biochimie
al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. V. Alexandrescu, *Comportarea electroforetică și imunoelectroforetică a proteinelor solubile din germenii de porumb*, St. cerc. biochim. **10**, *4*, 301 (1967).
2. V. Alexandrescu, *Raportul antigenic dintre proteinele solubile din axul embrionar al semințe*i *și alte formațiuni și organe ale porumbului*, St. cerc. biochim. **11**, *3* (1968).

3. V. ALEXANDRESCU, I. CĂLIN, *Comportarea electroforetică și imunoelectroforetică a proteinelor din axul embrionar al seminței de porumb după germinație*, St. cerc. biochim. **11**, *3* (1968).
4. V. ALEXANDRESCU, *Raportul antigenic dintre proteinele solubile din endospermul, scutelul seminței și alte formațiuni și organe ale porumbului*, St. cerc. biochim. **11**, *4* (1968).
5. J. J. SCHEIDEGGER, *Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse*, Int. Arch. Allergy **7**, 103 (1955).

ELECTROPHORESIS AND IMMUNOELECTROPHORESIS OF PROTEINS FROM THE ENDOSPERM AND GERMINATED SEED SCUTEL AND THEIR ANTIGENIC RELATIONS WITH OTHER PARTS AND ORGANS OF THE MAIZE

SUMMARY

Soluble proteins from the scutel of germinated seed of the maize are separated by agar gel electrophoresis in seven fractions and those from the scutel in ten fractions.

By means of antiprotein immune serum from the endosperm, in addition with the seed of maize (*Zea mays*) scutel, after 5—7 days from germination, 11 antigens in the endosperm and 15 antigens in the scutel were evidenced. The endosperm contains the same antigens as before germination while the scutel contains 4 new antigens. The leaf, in the stage of a plant with 4—5 leaves, contains 2 common antigens to the endosperm and scutel of the germinated seed.

By cross-reaction absorption of antisera no qualitative variations between sorts and varieties could be determined.

ST. CERC. BIOCHIM. II, 4, 363–369 (1968)

ACȚIUNEA UNOR REACTIVI CHIMICI ASUPRA PROTEINELOR CELULARE ÎN PROCESUL FIXĂRII

I. DATE CANTITATIVE CU PRIVIRE LA ACȚIUNEA ALCOOLULUI, ACETONEI ȘI ACIDULUI MONOIODACETIC ASUPRA AMINOACIZILOR LIBERI ȘI HIDROLIZATULUI PROTEIC

H. ARAȚEI și ALICE KAPRI

Rezumat. — S-a folosit ficat de șobolan, fixat și nefixat. Fixarea s-a făcut în acetonă, alcool 96% și acid monoiodacetic 2%, timp de 3 ore la rece (4°C). Analiza cromatogramelor efectuate pe omogenate de ficat a arătat că acetona păstrează cel mai bine aminoacizii legați proteic, iar alcoolul păstrează mai bine aminoacizii liberi pe cînd acidul monoiodacetic nu este un fixator bun pentru aminoacizi. Presupunem că identificarea histochimică a unui aminoacid se datorează prezenței lui în stare liberă și legată proteic.

Calitățile pe care trebuie să le îndeplinească un fixator sînt descrise aproape în toate monografiile de histochimie [3], [4], [12], [13], [14], [15], [16], [17]. Influența fixatorilor asupra compoziției chimice a țesuturilor, de exemplu a proteinelor, continuă să fie o problemă de studiu. Acțiunea formolului și a tetraoxidului de osmiu pare să fie în foarte multe cazuri rezolvată [15], dar în ceea ce privește acțiunea alcoolului, acetonei și acidului monoiodacetic se găsesc foarte puține date. Danielli [4] descrie influența alcoolului și acetonei asupra unor aminoacizi, ca de exemplu : histidina, tirozina, triptofanul, precum și asupra grupelor —SH și —S—S— din țesuturi, fără a prezenta date cantitative. Cel mai puțin a fost studiată acțiunea acidului monoiodacetic, probabil din cauza acțiunii sale distructive. În literatura avută la dispoziție am găsit o singură lucrare privitoare la influența acestui acid asupra grupelor —SH și —S—S— în procesul fixării țesuturilor [8].

Față de cele arătate mai sus, am încercat să studiem influența acetonei, alcoolului și acidului monoiodacetic asupra aminoacizilor liberi și a celor legați proteic.

MATERIAL ȘI METODĂ

Am folosit ficat de șobolan alb în greutate de cîte 125 — 150 g (am utilizat 10 șobolani). Din fiecare ficat s-au făcut patru probe, în felul următor : 1 g ficat s-a fixat în acetonă, 1 g s-a fixat în alcool 96%, 1 g

s-a fixat în acid monoiodacetic 2% soluție apoasă, iar 1 g ficat s-a folosit nefixat.

Înainte de fixare, fiecare gram de ficat era tăiat în felii de 1 — 3 mm. Fixarea s-a efectuat la temperatura de +4°C, timp de 2 ore și 30 min.

După fixare, țesutul a fost omogenizat cu ser fiziologic 8,5‰, diluția finală fiind de 1 g ficat la 6 ml ser fiziologic. Țesutul nefixat a fost supus omogenizării imediat după recoltare. După omogenizare am centrifugat probele timp de 20 min la 1 900 g și +4°C, în centrifuga cu răcire Janetzki K 23. Supernatantul s-a cules într-o eprubetă în care s-a făcut delipidarea cu cloroform. După îndepărtarea cloroformului, probele s-au prelucrat după tehnica folosită de unul din noi [10] și după indicațiile lui Hais și Macek [7]. Scopul final a fost evidențierea și dozarea cantitativă a aminoacizilor liberi și a celor legați proteic (hidrolizat). Exprimarea cantitativă a aminoacizilor s-a făcut în raport cu o cromatogramă etalon, formată dintr-un amestec de 13 aminoacizi a căror concentrație din amestec era cunoscută. Cromatografia amestecului etalon s-a executat în aceleași condiții ca pentru probele de cercetat.

REZULTATE

Tabelele 1 și 2 cuprind rezultatele determinărilor cantitative exprimate în mg/g țesut umed. Pe cromatogramele prelucrate în vederea determinării aminoacizilor liberi (AAL) s-au pus în evidență : fenilalanina-leucina-triptofanul, valina-metionina, alanina, histidina, cisteina, cistina, acidul aspartic, acidul glutamic, serina și glicina (tabela 1). Pe cromatogramele prelucrate în vederea determinării aminoacizilor rezultați din hidroliză (AAH) s-au obținut următorii aminoacizi : fenilalanina-leucina-triptofanul, valina-metionina, alanina, histidina, cisteina, cistina, acidul aspartic, acidul glutamic, serina, glicina, tirosina, arginina și, în cantități mai mici și sporadic, treonina, prolina și lizina. Ultimele trei n-au fost determinate cantitativ, din lipsa aminoacizilor etalon de com-

Tabela 1

Cantitatea de aminoacizi liberi (AAL) mg/g țesut umed (valori medii și deviația medie standard) pe un număr de probe $n = 10$

Nr. crt.	Denumirea aminoacidului	Fixatorul întrebuințat			Nefixat
		acetonă	alcool	acid iodacetic	
1	Fe-ala. Leu. Tri.	0,079±0,012	0,059±0,009	0,076±0,008	0,107±0,002
2	Val.-Met.	0,055±0,005	0,055±0,003	0,009±0,002	0,029±0,002
3	Ala.	0,364±0,016	0,389±0,022	0,184±0,011	0,458±0,009
4	His.	0,171±0,048	0,205±0,011	0,189±0,010	0,454±0,007
5	Cist.	0,298±0,016	0,286±0,017	0,073±0,015	0,368±0,013
6	Ci.	1,350±0,055	1,403±0,038	0,376±0,059	1,468±0,067
7	Ac. asp.	0,336±0,030	0,285±0,017	0,226±0,028	0,356±0,016
8	Ac.glu.	0,594±0,019	0,582±0,016	0,226±0,024	0,514±0,016
9	Ser.	0,194±0,011	0,204±0,013	0,206±0,011	0,450±0,012
10	Gli.	0,196±0,010	0,194±0,008	0,137±0,005	0,169±0,005
	Total	3,637	3,662	1,702	4,373

Tabela 2

Cantitatea de aminoacizi din hidrolizat (AAH) mg/g țesut umed (valori medii și variația medie standard) pe un număr de probe $n = 10$

Nr. crt.	Denumirea aminoacidului	Fixatorul întrebuințat			Nefixat
		acetonă	alcool	acid iodacetic	
1	Fe-ala.Leu.Tri.	1,793±0,014	0,832±0,055	1,338±0,012	2,325±0,017
2	Val.-Met.	0,752±0,053	0,802±0,045	0,000	1,050±0,036
3	Ala.	1,732±0,014	0,998±0,076	0,370±0,003	1,700±0,012
4	His.	5,820±0,025	5,240±0,028	0,625±0,009	4,210±0,019
5	Cist.	0,500±0,008	1,742±0,024	1,762±0,022	3,800±0,014
6	Ci.	9,220±0,058	8,110±0,054	0,625±0,016	8,120±0,094
7	Ac.asp.	7,080±0,042	7,020±0,016	4,620±0,035	9,280±0,066
8	Ac.glu.	12,150±0,057	12,040±0,024	2,950±0,025	13,650±0,049
9	Ser.	7,340±0,041	5,700±0,026	1,268±0,013	5,820±0,021
10	Gli.	4,880±0,036	3,518±0,012	0,657±0,006	3,000±0,010
11	Tir.	2,400±0,053	1,362±0,030	0,000	4,900±0,028
12	Arg.	1,156±0,010	1,325±0,011	0,000	1,618±0,014
13	Tre.	?	?	?	?
14	Pro.	?	?	?	?
15	Lis.	?	?	?	?
	Total	54,825	48,979	14,215	58,471

Tabela 3

Valoarea raportului cantitativ dintre aminoacizii din țesutul fixat și cel nefixat

Denumirea aminoacidului	Aminoacizi liberi (AAL)			Aminoacizi din hidrolizat (AAH)		
	acetonă	alcool	acid iod acetic	acetonă	alcool	acid iod acetic
Fe-ala. Leu. Tri.	0,73	0,55	0,71	0,77	0,35	0,57
Val. Met.	1,82	1,82	0,32	0,71	0,76	0,00
Ala.	0,79	0,85	0,40	1,18	0,58	0,21
His.	0,38	0,45	0,41	1,38	1,24	0,14
Cist.	0,80	0,77	0,20	0,13	0,45	0,46
Ci.	0,92	0,96	0,24	1,13	0,99	0,07
Ac. asp.	0,92	0,79	0,63	0,76	0,75	0,48
Ac. glu.	1,15	1,13	0,51	0,89	0,88	0,21
Ser.	0,43	0,45	0,45	1,26	0,97	0,21
Gli.	1,10	1,14	0,81	1,62	1,17	0,21
Tir.	0,00	0,00	0,00	0,49	0,27	0,00
Arg.	0,00	0,00	0,00	0,71	0,81	0,00

paraţie (tabela 2). În tabela 3 redăm raportul cantitativ dintre aminoacizii găsiţi după fixare şi aminoacizii din ţesutul proaspăt, nefixat.

Din tabele rezultă un anumit comportament al fixatorilor utilizaţi faţă de aminoacizii liberi, ca şi faţă de cei rezultaţi din hidroliză.

Aminoacizii liberi (AAL)

Printre acizii cei mai bine fixaţi în ţesutul hepatic se află valina-metionina, care depăşeşte cantitatea găsită în ţesutul nefixat (tabelele 1 şi 3). După valină-metionină urmează acidul glutamic, care este aproa-

pe la fel de bine fixat în acetonă și în acid monoiodacetic și mai slab fixat în alcool. Acizii cei mai slabi fixați sînt serina și histidina pentru toți fixatorii utilizați de noi. Se observă clar existența unui raport foarte scăzut între aminoacizii fixați și cei nefixați pentru histidină și serină, raportul fiind departe de cifra 0,75 admisă de noi ca limită optimă pentru identificarea histochimică (tabela 3). Ordinea de păstrare a aminoacizilor este următoarea : valină-metionină, acid glutamic, glicină, alanină, cisteină, acid aspartic și cistină, iar ceilalți aminoacizi se situează sub limita de 0,75 (pentru fixarea în alcool). Există o similitudine între fixarea cu alcool și fixarea cu acetonă, cu excepția cisteinei și alaninei, unde raportul este în favoarea fixării în alcool.

Aminoacizii rezultați prin hidroliză (AAH)

Din tabela 2 se observă că țesutul nefixat păstrează cantitatea cea mai mare de aminoacizi în comparație cu țesutul fixat. Considerînd fixarea în alcool, se observă că există precădere pentru anumiți aminoacizi, și anume : arginina și histidina. În ceea ce privește fixarea cu acetonă, se pare că în unele cazuri ea este superioară aceleia cu alcool, exemplu fiind fenilalanina-leucina, triptofanul, alanina, acidul aspartic. Ordinea în care scade concentrația este următoarea : glicină, histidină, serină, alanină, cistină, acid glutamic, fenilalanină-leucină, triptofan, acid aspartic. Restul aminoacizilor sînt sub valoarea minimă de 0,75. Acidul monoiodacetic păstrează cantitatea cea mai mică de aminoacizi, ca și în cazul AAL. În general, se pare că pentru AAH este mai indicat să folosim acetona. Acest lucru rezultă din tabelele 1 și 2.

DISCUȚII

Aminoacizii identificați de noi pe cromatogramele executate pe țesut nefixat sînt comparabili cu datele găsite în literatură [20], [21], [22], [24]. Dar, așa cum am arătat în introducere, se găsesc puține date privind acțiunea acetonei, alcoolului și acidului monoiodacetic în procesul fixării. Pearse [15] presupune că alcoolul ar acționa, în procesul fixării, prin rotirea lanțului proteic în afară, rupînd legătura de hidrogen și cea salină, scoțînd astfel în evidență grupele terminale ale catenei laterale. Aceeași părere este susținută și de Kiszely și Posalaky [12]. Presupunînd că această ipoteză este adevărată, ar rezulta că prin fixare în alcool obținem grupele reacționabile cu diverși reactivi specifici pentru AAH. În ceea ce privește AAL, ar trebui găsită o altă explicație. Oricum, aceasta rămîne o problemă deschisă.

Sudiind efectul diverșilor fixatori prin metoda spectrofotometrică, Gonçalves și colaboratori [5] arată că alcoolul etilic de 96% nu păstrează legătura —S—S—, dar ar putea conserva legătura —SH. Din datele noastre rezultă că alcoolul și acetona au o acțiune similară în ceea ce privește cisteina și cistina și că mai bine sînt păstrate grupele —S—S— din cistină decît grupele —SH din cisteină. Huggins [8], studiind acțiunea iodacetatului și iodacetamidei asupra compușilor tiolici, observă că pri-

mul reactiv reacționează mai violent asupra cisteinei pure, încălzite la 98°C și la pH = 7,4. Din datele noastre rezultă că acidul monoiodacetic 2% nu păstrează prea bine grupele —S—S— și grupele —SH, atît pentru AAL, cît și pentru AAH, și în general nici un aminoacid. Există însă o singură excepție, glicina din AAL, unde valoarea raportului este de 0,81 (tabela 3).

Fixarea probelor în acetonă nu diferă de fixarea în alcool. Astfel, pentru AAL procentul de aminoacizi găsiți este de 26% în acetonă și de 27% în alcool etilic (tabela 1), iar în ceea ce privește AAH fixarea este mai bună în acetonă (tabela 2). Privind aspectul aminoacizilor totali, se observă că cea mai mare cantitate se află în țesutul proaspăt nefixat (tabelele 1 și 2). Luînd în considerare variațiile individuale ale aminoacizilor, constatăm că în unele cazuri valorile aminoacizilor din țesutul fixat întrec valorile celor din țesutul nefixat. Acest lucru, la prima vedere, pare neverosimil, dar Roskin [17] arată că fixarea în alcool nu împiedică digestia ulterioară a proteinei de către tripsină și pepsină. Franklin și Quastel (citați după [7], p. 516) au constatat că în timpul cromatografierii multe enzime își păstrează parțial activitatea lor biologică, iar pentru developarea enzimelor se folosesc soluții apoase de alcool și acetonă. În afară de enzimele proteolitice, în țesutul fixat pot acționa o anumită perioadă de timp și alte enzime. Lison [14] arată că fosfataza alcalină își păstrează activitatea în proporție de 75% prin fixare în alcool, iar esterazele în proporție de 75% prin fixare în acetonă. Korhonen [11] arată că fixarea în acetonă absolută nu alterează decît foarte puțin, sau chiar de loc, activitatea pirofosfatazei anorganice. Calitățile acetonei și alcoolului în comparație cu alți fixatori sînt expuse și de alți autori [1], [2], [6], [9], [18]. Ceea ce trebuie subliniat este faptul că anumite enzime ar putea acționa asupra lanțului proteic, determinînd o creștere de valină-metionină, acid glutamic și glicină din probele de AAL, respectiv de histidină, glicină, cistină din AAH. De fapt, și Schurr [21] arată că există o mărire a cantității de aminoacizi datorită acțiunii enzimelor proteolitice.

O altă problemă care se pune este următoarea: prin reacție histochimică punem în evidență AAL, AAH sau totalul rezultat din suma lor ?

Din datele noastre rezultă că cel puțin o parte din AAL se păstrează prin fixare și că, prin urmare, prezența lor în țesut trebuie luată în considerare. Legat de acest fapt, este necesar să subliniem că părerea noastră rămîne valabilă numai pentru aminoacizii al căror raport față de țesutul nefixat se situează peste limita valorii de 0,75 și în limita valorii de 1. Așa de exemplu, este acidul aspartic sau alanina, dar în nici un caz valina-metionina, a cărei valoare este de 1,81, datorită acțiunii probabil enzimatice.

Ipoteza enunțată de Pearse [15] asupra acțiunii alcoolului în procesul fixării proteinelor ne face să presupunem că reacția histochimică se referă la AAH. Literatura de specialitate nu precizează nimic în acest sens. Este dificil să stabilim cu datele noastre care este realitatea. Se pare totuși că reacția histochimică reprezintă o sumă rezultată din aminoacidul care se păstrează atît în stare liberă, cît și legat proteic, cum este cazul acidului aspartic (prin fixare în acetonă și alcool), al fenilalaninei-triptofanului (prin fixare în acetonă). Pentru alți aminoacizi, reacția his-

tochimică s-ar datora numai AAH, cum e cazul argininei (fixare mai eficientă în alcool).

Ne propunem ca în lucrări ulterioare să aducem noi precizări în ceea ce privește acțiunea fixatorilor asupra micro- și macromoleculelor organice din țesuturi.

Prezentată la redacție la 1 februarie 1968

Institutul de cercetări medicale, Iași

BIBLIOGRAFIE

1. Bertalanffy D. F., *Acridin orange fluorescence procedure*, J. Amer. Cool. Med. Tech. **1**, *1*, 4–8 (1962).
2. Bhattacharya R., Sen P. B., *Influence of fixatives on mast cell count*, Acta Histochem. **28** 86–88 (1967).
3. Brachet J., Mirsky A. E., *The Cell*, Acad. Press, New York–Londra, 1959.
4. Danielli J. E., *Cytochemistry*, Ed. John Wiley and Sons, New York, 1953.
5. Gonçalves P., Cofre S., Valeri V., *Influence de divers fixateurs sur la réaction des groupes SH*, Ann. Histochim. **10**, *2*, 111–116.
6. Graumann W., Neumann K., *Handbuch der Histochemie*, vol. L/1, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1958.
7. Hais I. M., Macek K., *Cromatografia pe hîrtie*, Edit. tehnică, București, 1960.
8. Huggins Ch., Jensen E. V., *Thermal coagulation of serum proteins. I. The effects of iodacetate, iodacetamide and thiol compounds on coagulation*, J. biol. Chem. **179**, *2*, 645–654 (1949).
9. Jarrett A., Hardy I. A., *The value of alcohol for fixation of skin*, Stain Technology, **32**, *5*, 225–233 (1957).
10. Kapri A., *Cromatografia aminoacizilor din lichidul folicular și serul sanguin de suidee*, St. cerc. biochim., **10**, *3*, 257–267 (1967).
11. Kalevi L. Korhonen, *Histochemical demonstration of inorganic pyrophosphatases*, Second International Congress of Histo and Cytochemistry, Frankfurt/Main, 16–21 August 1964.
12. Kiszely G., Posalaky Z., *Mikrotechnische und histochemische Untersuchungsmethoden*, Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1964.
13. Lilli R. D., *Histopathologic technic*, The Blakiston Company, Phyladelphia-Toronto, 1948.
14. Lison L., *Histochimie et Cytochimie animales*, Ed. Gauthier Villars, Paris, 1960.
15. Pearse E., *Histochemistry, Theoretical and Applied*, ed. a 3-a, Churchill Ltd., Londra, 1961.
16. Romeis B., *Mikroskopische Technik*, R. Oldenbourg, München, 1948.
17. Roskin G. V., Levinson L. B., *Mikroskopiceskaia Tehnika*, Sovietskaia Nauka, Moscova, 1957.
18. Sagi E. S., Mackenzie L. L., *The use of acetone as a fixative in exfoliative cytological studies*, Amer. J. Obstet. Gynec. **73**, *2*, 473–439 (1957).
19. Schneider G., Schneider G., *Elektrophoretische Untersuchungen über die Wirkung von Gewebs-Fixierungsmitteln auf Eiweisslösungen*, Histochemie **8**, *2*, 138–154 (1967).
20. Schurr P. F., Thomson A. T., Hunderson C. M., Elvehjem C. A., *A method for the determination of free amino acids in rat organs and tissue*, J. biol. Chem. **181**, *1*, 29–37 (1950).
21. Solomon J. D., Johnson C. A., Scheffer L. A., Bergein O., *The determination of free and total amino acids in rat tissue*, J. biol. Chem. **189**, 625–635 (1950).
22. Soru E., *Biochimia medicală*, Edit. medicală, București, 1963.
23. Thomson W. S., *Selected Histochemical and Histopathological Methods*, Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, S.U.A., 1966.
24. Wiss O., *Untersuchungen über die freien Aminosäuren in der Leber bei verschiedener Ernährung III*, Helv. chim. Acta **32**, 1344 (1951).

THE ACTION OF SOME CHEMICAL REAGENTS ON CELL PROTEINS IN THE FIXATION PROCESS. I.

SUMMARY

We utilized in this experiment fixed and unfixed rat liver. The fixations were made in acetone, ethanol 96% and in 2% monoiodo acetic acid for three hours at +4°. The chromatographic analysis shows that acetone preserves better the protein-bound aminoacids than ethanol, while the latter preserves better the free aminoacids. Monoiod acetic acid is not a good fixative.

We suppose that the histochemical identification of an aminoacid is due to its presence in free and protein-bound state.

ST. CERC. BIOCHIM. II, 4, 371–375 (1968)

ABSORBȚIA SIMAZINULUI RADIOACTIV ÎN PLANTELE DE SECARĂ ȘI CREȘTEREA CONȚINUTULUI DE PROTEINĂ PRIN APLICAREA ATRAZINULUI

GH. BUDOI și S. K. RIES

Rezumat. — Folosind simazin radioactiv, s-a stabilit că activitatea nitrat reductazică crește o dată cu absorbția simazinului în plantele de secară. Atrazinul, în doze subtoxice, determină creșterea conținutului de substanțe proteice din plantele de secară.

Cercetări recente au dovedit că simazinul (2-cloro-4, 6-bisetilamino-S-triazina), în doze subtoxice, provoacă creșterea considerabilă a activității nitrat reductazice și a conținutului de substanțe proteice la unele plante de cultură.

Astfel, Ries [3] a constatat o creștere a conținutului de substanțe proteice cu 79% în plantele verzi de secară și cu 40% în semințe. În alte experiențe, Ries a înregistrat o creștere cu 52% a acestui conținut la raigras, cu 10% la lucernă și 12% la orz [4]. Activitatea nitrat reductazică a crescut de cîteva ori în comparație cu plantele netratate.

Analizele electroforetice nu au indicat diferențe calitative între substanțele proteice ale plantelor tratate și ale celor netratate [3].

În scopul de a aduce precizări privind unele efecte ale simazinului și atrazinului, am executat experiențe pentru a stabili corelația între absorbția simazinului și activitatea nitrat reductazică (experiențele 1 și 2) și pentru a cerceta efectul atrazinului (2-cloro-4-etilamină-6 izopropil-amino-S-triazină) asupra conținutului de substanțe proteice din plantele verzi (experiența 3).

MATERIAL ȘI METODĂ

În experiențele 1 și 2, semănatul s-a efectuat în vase de plastic conținînd vermiculit. Experiența 1 s-a executat în casa de vegetație, iar experiența 2 în camera de creștere. Condițiile din camera de creștere au fost: ziua de 16 ore, cu o temperatură de 22°C și intensitatea luminii de 2 000 lux, iar noaptea de 8 ore, cu o temperatură de 17°C.

Periodic, în vase s-au turnat cantități de cîte 100 cm^3 de soluție nutritivă, pregătită după Hoagland și Arnon [1]. Simazinul s-a adăugat în soluția nutritivă astfel: de 2 ori pentru experiența 1, și anume la 45 de zile după răsăritul plantelor, repetîndu-se a doua zi, iar pentru experiența 2 o singură dată, și anume la 75 de zile după răsărire. La ultima aplicare s-a folosit simazin marcat în lanț cu C^{14}. Cantitatea de simazin adăugată în soluția nutritivă la experiența 1 a fost de 0,08 ppm față de

soluția nutritivă. La experiența 2, pentru o serie de vase cu plante, simazinul s-a adăugat în concentrație de 0,04 ppm, iar pentru altă serie, în concentrație de 0,08 ppm față de soluția nutritivă.

La ambele experiențe, după aplicarea simazinului marcat, plantele s-au recoltat la diferite intervale, s-au făcut extracții din care s-a determinat radioactivitatea, în 6 repetiții, iar activitatea nitrat reductazică în 3 repetiții, după Sanderson și Cooking [6].Intervalele de analiză sînt trecute în tabelele 1 și 2.

Experiența 3 s-a executat în case de vegetație, folosind vase de tablă (17 × 20 cm), căptușite cu foi de material plastic. În fiecare vas s-au introdus 3,153 kg sol uscat, de textură luto-argiloasă, recoltat din cîmpul experimental al Departamentului de știința solului de la Universitatea de stat din Michigan. Cantitățile de atrazin s-au stabilit în funcție de greutatea solului din vas.

Variantele experienței au fost: *1* — netratat (martor); *2* — 0,1 ppm (0,250 kg atrazin/ha); *3* — 0,2 ppm (0,500 kg/ha); *4* — 0,3 ppm (0,750 kg/ha); *5*—0,4 ppm (1 kg/ha); *6* — 0,5 ppm (1,250 kg/ha). Cantitățile în kg corespund la suprafața de 1 ha pe adîncimea 0—20 cm. S-a lucrat în 4 repetiții.

Atrazinul s-a aplicat o dată cu apa, la începutul experienței. Umezirea s-a făcut omogen, pe straturi de sol, pe măsura umplerii vasului. Periodic, vasele cu sol au fost aduse la conținutul de 75% din capacitatea capilară pentru apă.

La 45 de zile după semănat, plantele au fost tăiate. S-au determinat masa verde și uscată, activitatea nitrat reductazică și conținutul de proteină, acesta din urmă după Lowry [2].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Aplicarea simazinului de 2 ori (experiența 1) a determinat creșterea activității nitrat reductazice. La 8 ore după aplicarea simazinului, diferența față de varianta netratată a fost de 142,5%. În acest timp s-a înregistrat și prezența radioactivității în plantele de secară (tabela 1).

În cazul cînd simazinul s-a aplicat o singură dată (experiența 2), nu s-au constatat diferențe față de martorul netratat în ceea ce privește activitatea nitrat reductazică. Rezultă astfel că doza de simazin aplicată a fost prea mică.

Tabela 1

Influența simazinului în concentrația de 0,08 ppm aplicat la plantele de secară crescute în casa de vegetație

Timpul după aplicarea simazinului (ore)	Dezintegrări pe minut	Activitatea nitrat reductazică (mmoli/g masă verde)		
		Martor	Simazin	%
0	—	18,09	22,91	
4	—	31,01	29,51	
8	32	33,72	81,75	242,5

DL 5 % pentru determinările de activitate nitrat reductazică efectuate la timpul de 8 ore = 15,07 %.

Din datele prezentate în tabela 2 se constată că viteza de absorbţie a simazinului creşte în timp, precum şi în funcţie de cantitatea de simazin aplicată în soluţie.

Tabela 2

Radioactivitatea din plantele de secară crescute în camera de creştere şi tratate cu simazin în concentraţie de 0,04 ppm şi 0,08 ppm

Timpul după aplicarea simazinului (ore)	Dezintegrări pe minut la concentraţia:	
	0,04 ppm	0,08 ppm
4	—	—
10	4	15
30	88	290
50	160	445

La experienţa 3 s-a constatat că, la 10 zile după răsărit, plantele din varianta 6 au început să sufere din cauza concentraţiei mari de atrazin, iar în decurs de o săptămînă ele au pierit. Cu două zile mai tîrziu, acelaşi fenomen s-a întîmplat la varianta 5. Plantele din varianta 4 nu au pierit, dar nu s-au mai luat în consideraţie, deoarece efectul negativ al atrazinului a fost evident.

Plantele din variantele 2 şi 3 au fost tot timpul de culoare mai verde decît plantele din varianta martor. Examinînd datele prezentate în tabelele 3 şi 4, se constată că activitatea nitrat reductazică şi procentul de substanţe proteice au fost mai mari la plantele de la aceste variante. Se dovedeşte însă superioară varianta cu doza de 0,1 ppm, la care s-a înregistrat aproape aceeaşi cantitate de masă verde ca şi la varianta martor, dar şi un spor de substanţe proteice de 28% pentru o plantă.

CONCLUZII

1. Absorbţia simazinului în plantă creşte în timp, precum şi în funcţie de doza de erbicid aplicată în soluţia nutritivă.

2. Între absorbţia simazinului în plante şi activitatea nitrat reductazică există o strînsă corelaţie. Activitatea nitrat reductazică se intensifică după absorbţia simazinului.

3. Aplicarea la plantele de secară a dozelor de atrazin subtoxice are efect asemănător cu al simazinului în ceea ce priveşte sporirea activităţii nitrat reductazice. Dozele subtoxice de atrazin nu influenţează producţia de masă verde şi uscată, dar determină o sporire considerabilă a activităţii nitrat reductazice şi a conţinutului de substanţe proteice din plantele de secară.

Prezentată la redacţie la 19 aprilie 1968

Institutul agronomic „N. Bălcescu", Catedra de agrotehnică, Bucureşti şi Universitatea de Stat, Michigan

Tabela 3

Influența atrazinului aplicat în sol înainte de semănat asupra cantității de substanță verde și uscată a plantelor de secară

Varianta	Doza de atrazin	Substanța verde (media)			Substanța uscată (media)			Raportul dintre substanța verde și uscată
		la vas g	la 1 plantă		la vas g	la 1 plantă		
			g	%		g	%	
1	netratat martor	10,0112	0,5006	100,00	0,1104	0,1104	100,00	4,53
2	0,1 ppm (0,250 kg/ha)	9,8110	0,4905	97,98	0,1027	0,1027	93,02	4,77
3	0,2 ppm (0,500 kg/ha)	6,6350	0,3180	63,52	0,0697	0,0697	63,14	4,76

DL 5% pentru substanța verde = 7,29%; DL 5% pentru substanța uscată = 8,46%.

Tabela 4

Efectul atrazinului aplicat în sol înainte de semănat asupra activității nitrat reductazice și a substanței proteice

Varianta	Doza de atrazin	Activitatea nitrat reductazică		Substanțe proteice		Substanțe proteice la 1 plantă	
		m moli/g	%	mg/g	%	mg/g	%
1	netratat-martor	29,015	100,00	7,595	100,00	3,802	100,00
2	0,1 ppm (0,250 kg/ha)	150,000	516,97	9,922	130,63	4,866	128,00
3	0,2 ppm (0,500 „)	1 125,000	3 877,30	13,125	172,81	4,174	109,77

DL 5% pentru activitatea nitrat reductazică = 456%; DL 5% pentru substanțele proteice = 256%.

BIBLIOGRAFIE

1. Hoagland D. R., Arnon D. I., Univ. Calif. Agr. Expt. Sta. Corc., 347 (1938).
2. Lowry O. H., Rosenrough N. J., Fan A. L., Randall R. J., *Protein measurement with the folinphenol reagent*, J. Biol. Chem., **193**, 265—267 (1951).
3. Ries S. K., Chmiel H., Dilley R. D., Filner P., *The increase in nitrate reductase activity and protein content of plants treated with simazine*, în *Proceed. of the Nat. Ac. of Science*, **58**, 2, 526—532, August, 1967.
4. Ries S. K., Schiezer C. J., Chmiel H., *The increase in protein content and yield of simazine treated crops in Michigan and Costa Rica*, Dep. of Hort. Michigan St. Univ. E. Lansig, oct. 1967.
5. Ries S. K., Gast A., *The effect of simazine on nitrogenous components of corn*, **13**, 272—274.
6. Sanderson G. W., Cocking E. C., Plant Physiol., **39**, 416 (1964).
7. Twedy J. A., Ries S. K., Plant Physiol., **42**, 280 (1967).

EXPERIMENTS REGARDING THE ABSORPTION OF RADIOACTIVE SIMAZINE AND THE INCREASE OF PROTEIN CONTENT DUE TO ATRAZINE APPLICATION TO RYE PLANTS

SUMMARY

Using radioactive simazine we established that nitrate reductase activity increases with the increase of simazine absorption in rye plants. The application of subtoxic doses of atrazine determines an increase in the protein content of rye plants.

ST. CERC. BIOCHIM. II, 4, 377–384 (1968)

CARACTERIZAREA SPECTROFOTOMETRICĂ A ADN DUPĂ IRADIERE *IN VIVO*

V. FRACȚIONAREA ADN EXTRAS DIN FICATUL ȘOBOLANILOR NORMALI SAU IRADIAȚI, PE COLOANĂ DE ALBUMINĂ METILATĂ

MARIA FURNICĂ

Rezumat. — Se fracționează pe coloană de albumină metilată-kieselgur ADN extras din ficat de șobolani normali sau iradiați cu 900 r, sacrificați după 10 zile de la iradiere. La eluția cu NaCl 0,4 — 0,9 M, ADN normal se separă în 4 fracțiuni principale, iar ADN extras de la șobolani iradiați, în 5 fracțiuni principale. Fracțiunea nouă de ADN care apare la șobolanii iradiați se eluează cu NaCl 0,5 M și reprezintă 1/5 din ADN total.

ADN normal sau iradiat, supus denaturării termice și apoi fracționării pe coloană, se separă în același număr de fracțiuni ca și înainte de denaturare : 4 fracțiuni în ADN normal, 5 fracțiuni în ADN iradiat.

Studiul comportării diferitelor fracțiuni de ADN eluate de pe coloana de albumină metilată față de acțiunea căldurii arată că fracțiunile I, IV, și V, reprezentînd 37 % din ADN iradiat, sînt rezistente la această acțiune. Fracțiunile I și III din ADN iradiat sînt rezistente la acțiunea DN-azei pancreatice. Fracțiunea nouă de ADN care apare după iradiere (fracțiunea II) nu este rezistentă la agenții denaturați folosiți.

Din rezultatele prezentate în lucrări anterioare reiese că ADN extras din ficatul șobolanilor iradiați cu doze letale și sacrificați după 10 zile de la iradiere prezintă unele modificări ale proprietăților sale fizico-chimice, manifestate prin rezistență la căldură, alcalii, desoxiribonuclează pancreatică și iradiere *in vitro* [1], [2], [3], [4].

Pentru a aduce lămuriri suplimentare asupra structurii ADN extras de la animale iradiate, am fracționat acest ADN pe coloană de albumină metilată-kieselgur. Am ales în mod special albumina metilată, și nu alt material adsorbant, întrucît ea se pretează în mod deosebit scopurilor urmărite de noi; așa cum au arătat Sueoka și Cheng [5], [6], albumina metilată fracționează ADN după compoziția bazică (*guanosine-citosine effect*), după legăturile de hidrogen (*binding effect*) și după dimensiunile moleculare (*size effect*). Fracțiunile eluate cu soluții de putere ionică crescîndă conțin molecule de complexitate crescută, o astfel de fracționare permițînd un studiu mai aprofundat al caracteristicilor ADN.

MATERIAL ŞI METODĂ

Experienţele au fost efectuate pe ADN extras din ficatul şobolanilor iradiaţi cu 900 r şi sacrificaţi după 10 zile de la iradiere. Ca martor s-a folosit ADN extras din ficat de şobolani normali. Extracţia ADN s-a făcut prin metoda Zamenhof — Griboff — Marillo [7]. După purificări repetate cu amestec de cloroform-alcool octilic (5 :1), preparatul de ADN prezintă o reacţie Lowry negativă. Acest preparat de ADN a fost supus fracţionării pe coloană de albumină metilată.

S-a lucrat pe albumină serică bovină (produs Sigma), metilată după tehnica lui Mandell şi Hershey [8]. Albumina metilată a fost fixată pe suport de kieselgur, în „tampon salin" (soluţie 0,05 M tampon fosfat de pH 6,8 care conţine 0,1 moli NaCl/l). Coloanele utilizate pentru efectuarea acestor experienţe au fost de $9 \times 0{,}9$ cm şi au conţinut cantitatea de material adsorbant pe o înălţime de 4 cm. Fracţionarea ADN pe această coloană de albumină metilată-kieselgur s-a făcut după tehnica lui Sueoka şi Cheng [5]. Înainte de utilizare, coloana s-a spălat cu 10 volume de NaCl 0,3 M, dizolvată în tampon fosfat 0,05 M de pH 6,8. Pentru fiecare experienţă s-au pus pe coloană cîte 100 γ ADN conţinut în 5 ml tampon salin standard (0,14 M NaCl + 0,014 citrat de sodiu). Eluţia s-a efectuat cu 90 ml NaCl de concentraţie 0,4—0,9 M, dizolvată în tampon fosfat. S-au colectat 34 fracţiuni de cîte 3 cm^3 eluent.

Pentru studiul ADN denaturat, preparatul de ADN extras de la animale normale sau iradiate a fost supus acţiunii căldurii la 90°C, timp de 10′, răcit brusc, lăsat să-şi reia temperatura camerei şi apoi pus pe coloană. În aceste experienţe, coloana de albumină metilată-kieselgur s-a spălat cu NaCl 0,6 M, dizolvată în tampon fosfat, iar eluţia ADN denaturat s-a realizat cu soluţii de NaCl 0,7 — 1,2 M.

Repartiţia cantitativă a ADN în diferitele fracţiuni eluate de pe coloana de albumină metilată s-a făcut după reunirea tuturor probelor eluate cu aceeaşi concentraţie de NaCl, prin determinarea extincţiei la la 260 mμ şi comparaţia ulterioară cu exctincţia ADN nefracţionat.

Studiul proprietăţilor diferitelor fracţiuni eluate de pe coloana de albumină metilată s-a efectuat după reunirea probelor eluate cu aceeaşi concentraţie de NaCl; fiecare fracţiune a fost supusă acţiunii căldurii [1] sau desoxiribonucleazei pancreatice [4], după care s-a determinat efectul hipercromic la 260 mμ. În acest fel s-a urmărit comportarea diferitelor fracţiuni izolate faţă de acţiunea agenţilor denaturanţi.

REZULTATE

Fracţionarea ADN nativ. Din figura 1 se constată că ADN extras din ficatul şobolanilor normali se separă cu ajutorul coloanei de albumină metilată în 4 fracţiuni principale:

fracţiunea I,	eluată	cu	NaCl	0,4 M,
fracţiunea II	„	„	„	0,6 M,
fracţiunea III	„	„	„	0,7 M,
fracţiunea IV	„	„	„	0,8 M.

În ADN extras de la animale iradiate apare o fracțiune în plus, care se eluează cu NaCl 0,5 M. Diagrama de eluție a ADN iradiat apare puțin deplasată spre stînga, adică pe zona care se eluează cu soluții de NaCl de putere ionică mai redusă (fig. 1).

Din tabela 1 rezultă cantitatea de ADN care s-a repartizat în diferitele fracțiuni studiate. În cazul ADN normal, o cantitate mare (33%)

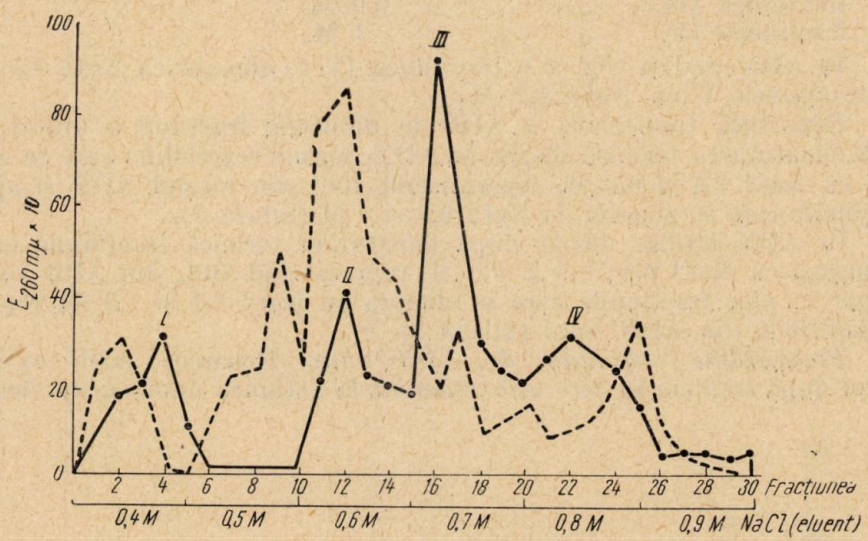


Fig. 1. — Diagrama de eluție a ADN extras din ficatul șobolanilor normali sau iradiați, după fracționare pe coloană de albumină metilată-kieselgur.

se repartizează în fracțiunea III, eluată cu NaCl 0,7 M. ADN iradiat prezintă cantitatea maximă (41%) în fracțiunea II, eluată cu NaCl 0,6 M. Subliniem că în eluatul cu NaCl 0,6 M, ADN normal se găsește doar în proporție de aproximativ 50% față de ADN iradiat (tabela 1).

Tabela 1

% ADN normal sau iradiat, repartizat în diferite fracțiuni separate pe coloana de albumină metilată

Fracțiunea	ADN normal %	ADN iradiat %
0,4 M	15,4	10,5
0,5 M	1,5	18,5
0,6 M	23,3	41,5
0,7 M	33	14
0,8 M	23,3	13,2
0,9 M	3	2,8

Fracționarea ADN denaturat. În figura 2 am reprezentat diagrama de eluție a ADN extras de la șobolani normali sau iradiați, după denaturare termică. Am constatat că după denaturarea termică, cele două categorii de ADN — normal sau iradiat — se separă în același număr

de fracţiuni ca şi înainte de denaturare : în ADN normal apar 4 fracţiuni, în ADN iradiat se separă 5 fracţiuni. Aceste fracţiuni denaturate în prealabil sînt eluate cu alte concentraţii de NaCl decît ADN nativ, după cum urmează :

fracţiunea I, eluată cu NaCl 0,7 M,
fracţiunea II „ „ „ 0,8 M,
fracţiunea III „ „ „ 0,9 M,
fracţiunea IV „ „ „ 1 M.

În ADN iradiat (fig. 2), fracţiunea IV se eluează cu NaCl 1,1 M, iar fracţiunea V cu NaCl 1,2 M.

Repartiţia cantitativă a ADN în diferitele fracţiuni a arătat că după denaturarea termică dispar în ADN normal fracţiunile care se eluează cu NaCl 0,4 şi 0,6 M, reprezentînd 40% din totalul ADN şi apar fracţiunile care se eluează cu NaCl 0,9 şi 1 M (tabela 2).

În ADN iradiat dispar după denaturare termică fracţiunile care se eluează cu NaCl 0,4 ; 0,5 şi 0,6 M, reprezentînd 70% din ADN total şi apar în plus fracţiunile care se eluează cu NaCl 1,1 şi 1,2 M, reprezentînd 26% din ADN total (tabela 2).

Proprietăţile fracţiunilor de ADN nativ. Deoarece ADN extras de noi după iradiere *in vivo* este rezistent la acţiunea unor agenţi dena-

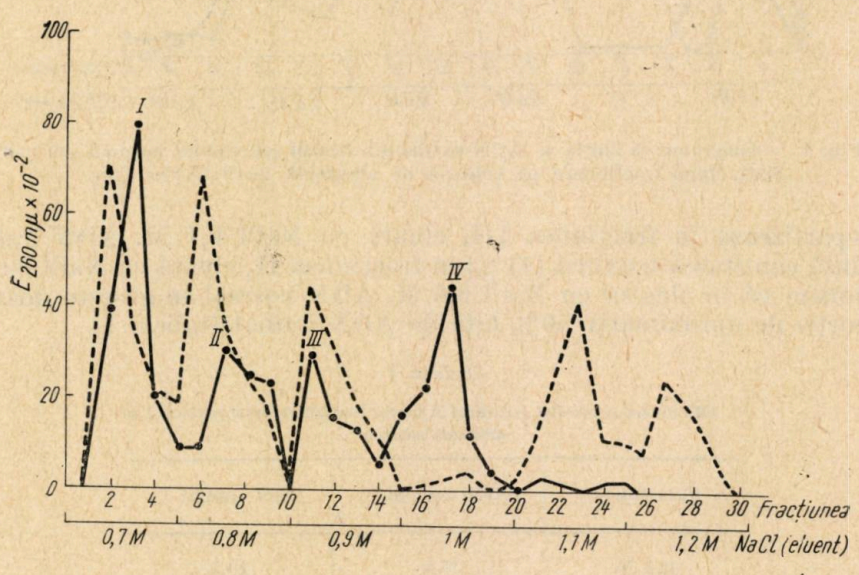


Fig. 2. — Diagrama de eluţie a ADN normal sau iradiat, fracţionat pe coloană de albumină metilată-kieselgur după denaturare termică.

turanţi, am încercat să stabilim care este fracţiunea din ADN implicată în acest proces.

În ADN normal, toate cele 4 fracţiuni sînt sensibile la acţiunea căldurii, dar intensitatea efectului hipercromic la 260 mμ variază : efectul hipercromic maxim se constată în fracţiunea de ADN (38%) eluată cu NaCl 0,6 M. În cazul ADN iradiat, efectul hipercromic maxim (30%)

se constată tot în fracțiunea eluată cu NaCl 0,6 M. Nu am găsit efect hipercromic în fracțiunea de ADN iradiat, eluată cu NaCl 0,4 M (tabela 3).

La acțiunea desoxiribonucleazei pancreatice sînt sensibile toate fracțiunile de ADN normal, dar efectul maxim (36% și 32%) se constată la fracțiunile eluate cu NaCl 0,6 și 0,4 M. În ADN iradiat, toate

Tabela 2

% ADN normal sau iradiat (900 r, 10 zile) repartizat în diferite fracțiuni separate pe coloana de albumină metilată, după denaturare termică

Fracțiunea NaCl	ADN normal %	ADN iradiat %
0,7 M	36,8	25,5
0,8 M	21,6	25,8
0,9 M	15,7	18,8
1 M	25,4	1,8
1,1 M	—	17,1
1,2 M	—	9

fracțiunile sînt susceptibile la acțiunea DN-azei, dar în grade diferite; fracțiunile izolate cu NaCl 0,4 și 0,6 M sînt cele mai rezistente (tabela 3).

Tabela 3

Proprietățile fracțiunilor de ADN normal sau iradiat (fiecare cifră din tabelă reprezintă media a cîte 5 determinări)

ADN normal	% efect hipercromic		ADN iradiat	% efect hipercromic	
	căldură	DN-ază		căldură	DN-ază
total	38	29	total	17	19
0,4 M	19	32	0,4 M	0	8
0,5 M	—	—	0,5 M	20	25
0,6 M	38	36	0,6 M	30	6
0,7 M	23	24	0,7 M	7	18
0,8 M	25	14	0,8 M	13	17

DISCUȚII

Modificarea profilului cromatografic al ADN după iradierea *in vivo* a fost pusă în evidență numai pentru ADN extras din organe radiosensibile. Astfel, Ord și Stocken [9] găsesc că la 15′ după iradiere, ADN extras din timusul șobolanilor iradiați cu 1 000 r se deosebește de ADN normal. Acest ADN, fracționat pe coloană de ECTEOLA-celuloză se găsește în cantitate mai mare în fracțiunea ce se eluează cu NaCl 2 M/NH_3 0,1 M, fapt pe care autorii îl consideră ca indice al lezării „primerului" de ADN. Bauer, Loring și Kurnick [10] constată că, la 24 ore după iradiere, în ADN din timus separat pe ECTEOLA, apare un nou vîrf, însoțit de o creștere a cantității de ADN care se eluează la concentrații mai mici. Modificări asemănătoare se găsesc la ADN extras din splină, dar nu și la cel extras din rinichi, considerat organ radio-

rezistent. Aceste rezultate demonstrează că şi după iradiere *in vivo* se produce degradarea macromoleculei de ADN, dar numai în organe radiosensibile. Tot în organe radiosensibile, Voiculeţ, Maisin şi Ledoux [11], [12] găsesc că în primele 48 de ore de la iradierea şoarecilor cu 1 350 r se constată scăderea încorporării timinei-H^3 în ADN total şi în diferitele fracţiuni izolate prin cromatografie pe coloană de DEAE-celuloză.

Noi am demonstrat că în faze tardive ale postiradierii, şi anume la 10 zile, apar modificări structurale, chiar şi în ADN extras din organe radiorezistente. Cum aceste modificări se manifestă prin deplasarea diagramei de eluţie spre concentraţii mai mici de NaCl, putem considera că este vorba de o oarecare scădere a greutăţii moleculare la nivelul tuturor fracţiunilor. Nu putem vorbi despre o influenţă a legăturilor de hidrogen, deoarece în acest caz diagrama de eluţie ar fi trebuit să se deplaseze spre concentraţii mai mari de NaCl.

Fracţionarea ADN pe o coloană de albumină ne-a mai adus şi o altă precizare, şi anume că în preparatul de ADN extras de la animale iradiate nu avem, alături de moleculele bicatenare, şi molecule de ADN denaturat. Acest lucru se dovedeşte prin eluţia cu NaCl 0,4—0,8 M a întregului ADN pus pe coloană (97%) şi prin deplasarea profilului cromatografic spre eluenţi cu putere ionică mică. Sub acest aspect, comportarea ADN iradiat cu radiaţii X se deosebeşte de a celui iradiat cu radiaţii UV, care nu mai poate fi eluat în întregime de pe coloană [13], [14].

Profilul cromatografic al ADN denaturat termic corespunde modificărilor fizico-chimice cunoscute că se produc la încălzire [15], [16]. Desfacerea legăturilor de hidrogen şi apariţia ADN monocatenar se manifestă prin apariţia fracţiunilor care se eluează cu NaCl mai concentrată.

Rezultatele prezentate ridică totuşi o problemă, şi anume a existenţei în aceeaşi zonă (de ex. în fracţiunea NaCl 0,7 M) a ADN nativ şi denaturat termic. Rosenkranz şi Bendich [17] au observat un fapt asemănător la cromatografierea pe ECTEOLA a ADN nativ şi denaturat din timus de viţel. Acest fapt se poate datora structurii diferite a ADN nativ, faţă de cel denaturat. Dacă presupunem că poziţia moleculei de ADN este determinată de numărul de grupări fosfat legate de albumină, în cazul ADN nativ acestea vor fi mai puţin numeroase şi preparatul se va elua mai repede ; moleculele mai lungi vor fi legate la suprafaţa adsorbantului prin mai multe legături şi, în consecinţă, vor fi eluate de eluenţi cu putere ionică mare. În cazul ADN denaturat termic apar însă mai multe grupări fosforice decît în molecula rigidă, nativă, de ADN, astfel încît, pentru o lungime egală a lanţului, ADN denaturat va fi mai puternic legat decît ADN nativ. În schimb, în cazul ADN complet denaturat, concentraţia salină necesară pentru eluţie va fi identică cu cea necesară pentru a elua o moleculă nativă de greutate moleculară dublă, dar de aceeaşi lungime [10]. În ADN iradiat avem molecule nedenaturate, care şi-au păstrat structura bicatenară şi constituie marea proporţie din fracţiunea de ADN încălzită, eluată cu NaCl 0,7 M.

Studiul comportării diferitelor fracţiuni de ADN la acţiunea căldurii şi desoxiribonucleazei ne-a adus unele lămuriri suplimentare. În primul rînd am constatat că fracţiunea mai rezistentă la acţiunea căldurii (în ADN iradiat) este cea eluată cu NaCl 0,4 M, şi nu fracţiunea care apare

în plus în ADN iradiat, așa cum ne-am fi așteptat. Rezistența ADN total la acțiunea desoxiribonucleazei de asemenea nu poate fi explicată prin fracțiunea nouă care apare în ADN iradiat, deoarece fracțiunile mai rezistente la acțiunea DN-azei sînt cele eluate cu NaCl 0,4 și 0,6 M. Prin urmare, localizarea modificărilor fizico-chimice găsite de noi în ADN extras de la animale iradiate cu doze letale este legată în special de fracțiunea izolată de NaCl 0,4 M, care reprezintă cam 10% din ADN total (tabela 1). Dacă la acești 10 % adăugăm 14% și 13%, cantitățile corespunzătoare fracțiunilor izolate în NaCl 0,7 și 0,8 M (tabela 1), care prezintă și ele un efect hipercromic redus sub acțiunea căldurii, se ajunge la 37% ADN modificat după acțiunea iradierii. Rezultă, de asemenea, din tabela 1 că fracțiunile termorezistente sînt repartizate în macromolecule cu greutăți moleculare diferite (eluate cu NaCl 0,4; 0,7 și 0,8 M).

Aceste experiențe arată deci că între ADN normal și cel iradiat *in vivo* există diferențe de greutate moleculară (fracțiunea II) și de stabilitate a helixului la acțiunea agenților denaturați (fracțiunile I, IV, V) și că ele nu se datoresc prezenței unor molecule denaturante în urma iradierii.

CONCLUZII

1. Fracționarea ADN pe coloană de albumină metilată-kieselgur duce la izolarea a 4 fracțiuni în cazul ADN normal și a 5 fracțiuni în cazul ADN extras de la animale iradiate.

2. După denaturare termică și fracționare pe coloană, se separă același număr de fracțiuni ca în cazul ADN nativ, dar ele se eluează cu NaCl cu putere ionică crescută.

3. Fracțiunile de ADN iradiat, eluate cu NaCl 0,4; 0,7 și 0,8 M, reprezentînd 37% din ADN total, sînt mai rezistente la acțiunea căldurii.

4. Fracțiunile de ADN iradiat, eluate cu NaCl 0,4 și 0,6 M sînt mai rezistente la acțiunea DN-azei pancreatice.

Prezentată la redacție la 8 mai 1968

Institutul oncologic, București

BIBLIOGRAFIE

1. M. Furnică, *Caracterizare spectrofotometrică a ADN după iradiere* in vivo. *I. Comportarea față de acțiunea unor agenți denaturanți (căldură, alcalii, acizi)*, St. cerc. biochim., **10**, 277 (1967).
2. M. Furnică, *DNA spectrophotometric characterization after irradiation* in vivo. *II. Thermic transition and influence exerted by radioprotective and radiosensitizing substances*, Rev. roum. Biochim., **5**, 113 (1968).
3. M. Furnică, *DNA spectrophotometric characterization after irradiation* in vivo. *III. Influence of in vitro irradiation on behaviour towards denaturing agents of DNA extracted from normal or irradiated animals*, Rev. roum. Biochim., **5** (1968).
4. M. Furnică, *Caracterizare spectrofotometrică a ADN după iradiere* in vivo. *IV. Acțiunea DN-azei asupra ADN extras de la animale normale sau iradiate.*, St. cerc. biochim., **11**, (1968).
5. N. Sueoka, Ts'ai Ying Cheng, *Fractionation of nucleic acids with the methylated albumin column*, J. Mol. Biol., **4**, 161 (1962).
6. Ts'ai Ying Cheng, N. Sueoka, *Heterogeneity of DNA in density and base composition*, Science, **141**, 1194 (1963).

7. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 1957, 697.
8. J. D. Mandell, A. D. Hershey, Anal. Biochem., **1**, 66 (1960).
9. G. Ord, L. A. Stocken, *Structural changes after X-irradiation* in vivo, Biochim, Biophys., Acta, **37**, 352 (1960).
10. R. D. Bauer, W. Loring, N. B. Kurnick, *Studies on DNA of irradiation damaged nucleoprotein*, Radiation Res., **26**, 507 (1965).
11. N. Voiculeț, J. R. Maisin, L. Ledoux, *Efectul radiațiilor ionizante asupra biosintezei și profilului cromatografic al ADN*, Fiziol. norm. patol., **XIII**, 525 (1967).
12. N. Voiculeț, *Stabilitatea și profilul cromatografic al ADN din unele țesuturi de șobolan*, Radiobiologia, Biologia moleculară, Ed. medicală, București, 1967, p. 127.
13. H. Kubinski, *Effect of U.V. irradiation of RNA on its chromatographic behaviour*, Nature, **200** (4904), 595 (1963).
14. L. Popa, Aurelia Cruceanu, R. Portocală, *Column chromatography of mouse brain RNA subjected to the action of UV light*, Rev. roum. Biochim., **4**, 199 (1967).
15. M. Roger, Ch. O. Beckmann, R. D. Hotchkiss, *Separation of native and denatured fractions from partially denatured pneumococcal DNA*, J. Mol. Biol., **18**, 156 (1966).
16. R. F. Steiner, R. F. Beers, *Polynucleotides, natural and synthetic nucleic acids*, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam, 1961.
17. S. Rosenkranz, A. Bendich, *Studies on the effect of heat on deoxyribonucleic acid*, J. Am. Chem. Soc., **81**, 6255 (1952).

DNA SPECTROPHOTOMETRIC CHARACTERIZATION AFTER IRRADIATION *IN VIVO*.

V. FRACTIONATION OF DNA EXTRACTED FROM THE LIVER OF NORMAL OR IRRADIATED RATS ON METHYLATED ALBUMIN COLUMN

SUMMARY

DNA extracted from the liver of rats, 10 days after an irradiation with 900 r, is fractionated on a column of methylated albumin-kieselgur (MAK). In elution with NaCl 0.4 M—0.9 M, the normal DNA is separated into 4 fractions, while from the irradiated DNA 5 main fractions are obtained. The new fraction of DNA wich appeared in the irradiated rats was eluted with 0.5 M NaCl and represents 1/5 from the total DNA content.

The normal or irradiated DNA, subjected to thermic denaturation and then fractionated on MAK, separated into the same number of fractions as before denaturation : 4 fractions of normal DNA and 5 fractions of irradiated DNA.

The study of properties of different DNA-fractions eluted from the MAK-column, towards the heat action, shows that the fractions I, IV and V, representing 37% from the irradiated DNA, are thermoresistant. The fractions I and III from the irradiated DNA are resistent to the action of pancreatic DN-ase. The new fraction of DNA which appeared after irradiation (fraction IV) is not resistent to the denaturating agents used.

ST. CERC. BIOCHIM. **11**, *4*, 385–389 (1968)

CARACTERIZAREA IMUNOELECTROFORETICĂ A LANȚURILOR POLIPEPTIDICE ȘI A FRAGMENTELOR IgG DE IEPURE*

VICTOR GHEȚIE

Rezumat.— S-au analizat prin imunodifuzie, utilizînd seruri imune de porumbel anti lanț L și H de iepure și seruri imune de cobai anti IgG de iepure, subunități ale IgG obținute prin hidroliză enzimatică (papainǎ, pepsinǎ) și reducere chimică cu β-mercaptoetanol (lanț L, lanț H, fragmente Fab, Fc, Fd′ și Fd). S-a constatat că fragmentul Fd (Fd′) prezintă o reacție de identitate parțială cu lanțul H. Între fragmentele Fd și Fd′ nu s-au putut evidenția deosebiri imunochimice. S-a semnalat o reacție între serul anti L și fragmentul Fd (Fd′). Se aduc argumente în favoarea unei înrudiri antigenice între fragmentul Fd (Fd′) și lanțul L.

Analiza imunoelectroforetică a fragmentelor rezultate din hidroliza enzimatică a imunoglobulinelor și a lanțurilor polipeptidice ce le compun poate furniza date în legătură cu modul de asamblare a diferitelor fragmente în molecula anticorpilor de iepure de tip IgG**.

Desfacerea moleculei intacte în subunități componente s-a făcut utilizînd două procedee ale căror detalii au fost date într-o altă lucrare [4].

1. Hidroliza IgG cu papainǎ și separarea fragmentelor Fab I, Fab II și Fc prin cromatografie pe CM-Sephadex cu tampon acetat, pH = 5,4 și un gradient de molaritate 0,03—0,3 M.

Fragmentul Fab II s-a redus cu β-mercaptoetanol în mediu de uree 6 M, iar produșii de scindare, anume fragmentul Fd și lanțul polipeptidic L, s-au separat prin gel filtrare pe Sephadex G-100, cu acid acetic N și uree 6 M.

2. Reducerea IgG cu β-mercaptoetanol și separarea lanțurilor polipeptidice H și L prin gel filtrare pe Sephadex G-100, cu acid acetic N.

Lanțul H a fost hidrolizat cu pepsinǎ și fragmentul Fd′ s-a separat de produșii de hidroliză ai fragmentului Fc prin gel filtrare pe Sephadex G-75, cu NaCl 0,145 M.

Analiza imunoelectroforetică și prin dublă difuzie a diferitelor fragmente izolate și precipitate a condus la rezultatele înfățișate în figura 1.

---

* Lucrare prezentată la Simpozionul de imunoelectroforeză, 9 decembrie 1967.

** Pentru denumirea fragmentelor s-a utilizat nomenclatura internațională uzuală (Bull. World Health Organ., **30**, 447 (1964)).

Datele de imunodifuzie sînt în concordanță deplină cu structura tetracatenară a IgG, susținută de R.R. Porter [6], și permit un aranjament al diferitelor fragmente în acord cu datele din literatură privitoare la antigenicitatea lanțurilor L și H.

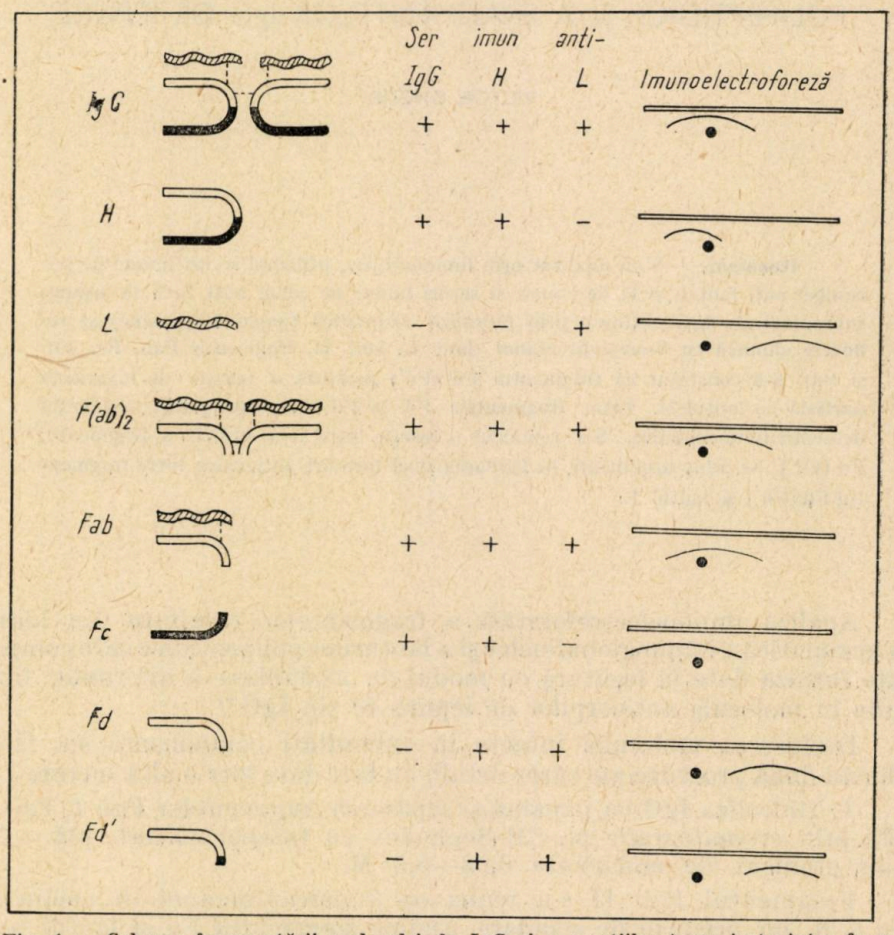


Fig. 1. — Schema fragmentării moleculei de IgG și a reacțiilor încrucișate între fragmentele și lanțurile polipeptidice. La imunoelectroforeză liniile de precipitare sînt date de antiserurile specifice (pentru F $(ab)_2$, Fab și Fd de serul anti-lanț H).

O mențiune specială se poate face pentru fragmentul Fd, respectiv Fd'. La iepure, studiul imunochimic al acestor fragmente este abia la început [3], [7]. S. Utsumi și F. Karush [9], [10] constată că acest fragment nu reacționează cu serul de capră anti lanț H de iepure și trag concluzia că el nu poartă grupări determinante capabile să producă anticorpi specifici.

Serul de porumbel anti lanț H de iepure, utilizat de noi, este capabil să evidențieze o reacție de identitate parțială între lanțul H și fragmentele Fd sau Fd' (fig. 2). Fuzionarea liniei fragmentului Fd cu aceea a lanțului H și păstrarea pintenului la aceasta din urmă arată că, în ca-

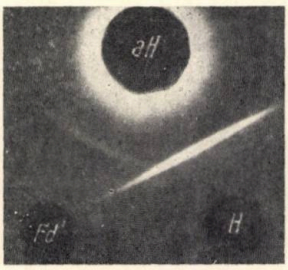


Fig. 2. — Reacţia de identitate parţială dintre lanţul H şi fragmentul Fd'.

H = lanţul H; Fd' = fragmentul Fd'; aH = ser de porumbel anti lanţ H de iepure.

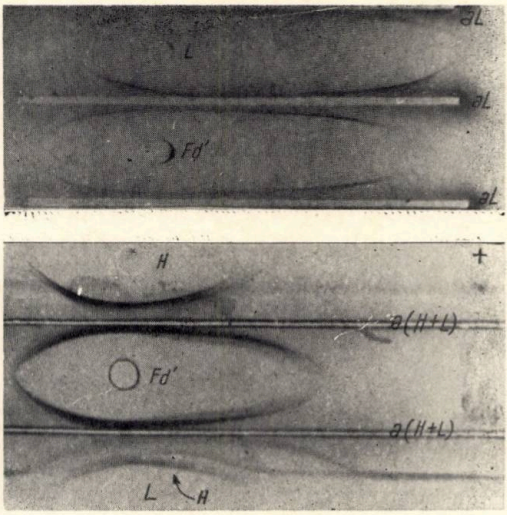


Fig. 3. — Imunoelectroforegrama fragmentului Fd' şi a lanţului L şi H cu seruri imune anti H şi anti L.

H = lanţ H; L = lanţ L; Fd' = fragment Fd'; aL = ser de porumbel anti L; a(H + L) = seruri de porumbel anti L şi anti H amestecate în proporţii egale.

zul nostru, anticorpii anti lanț H sînt un amestec de cel puțin două populații, una capabilă să reacționeze cu grupări determinante din fragmentul Fd (Fd'), alta capabilă să se combine cu grupările determinante ale fragmentului Fc.

Fragmentele Fd și Fd' deși au fost obținute prin două metode diferite, nu prezintă deosebiri fizico-chimice și imunochimice. Acest fapt arată că porțiunea de lanț pe care fragmentul Fd' o conține în plus față de Fd (Ser. Liz. Pro. Tre. Cist. Pro. Pro. Pro. Glu. Leu.) [8] nu are grupări determinante sesizabile prin serul de porumbel anti lanț H de iepure folosit.

Fragmentul Fd (Fd') reacționează cu serurile de porumbel anti lanț L (fig. 3). Această comportare este neașteptată și ridică o problemă teoretică importantă : există oare o înrudire antigenică între lanțul L și capătul N-terminal al lanțului H ce este cuprins în fragmentele Fd sau Fd' ?

Înainte de a accepta ca o concluzie sigură a experiențelor noastre ideea unei comuniuni antigenice între lanțul L și fragmentul Fd (Fd'), am analizat sursele unor posibile erori, și anume :

1. Fragmentul Fd (Fd') conține impurități din lanțul L. Această posibilitate este contrazisă de poziția liniilor de precipitare, și anume : fragmentul Fd' are o mobilitate mai mică decît aceea a lanțului L (fig. 3). Or, dacă impuritățile de L prezente în fragmentul Fd' ar fi fost responsabile pentru reacția observată, linia de precipitare ar fi trebuit să se formeze în zona etalării lanțului L, ceea ce nu se constată.

2. Serul de porumbel anti L conține anticorpi anti H, datorită faptului că preparatele de lanț L utilizate la imunizarea porumbeilor puteau conține urme din lanțul H. Efectuînd analiza imunoelectroforetică comparativă a lanțurilor L și H și a fragmentului Fd, cu ajutorul unui amestec de seruri imune anti L și anti H (fig. 3), s-a observat că linia de precipitare dată de fragmentul Fd' cu anticorpii anti H are un aspect și o poziție diferită de cea dată cu anticorpii anti L. Deci, nu anticorpii anti H, care ar putea fi prezenți în serul anti L, dau linia de precipitare caracteristică. Faptul că pentru preparatul nostru de lanț L s-a obținut și linia caracteristică lanțului H arată că în preparatul de L pot exista impurități de H.

3. Fragmentul Fd (Fd') are impurități de lanț L, cu care se combină, reformînd un fragment similar Fab care poate reacționa cu serul anti L. Această posibilitate este cel mai greu de înlăturat. Fragmentul Fab are la iepure o mobilitate mai mare decît fragmentul Fc [4] și apropiată de a fragmentului Fd (Fd') analizat. Doar aspectul liniei de precipitare este diferit, aceasta prezentînd o rază de curbură mai mare decît aceea a fragmentului Fd. Această diferență dintre Fd și Fab nu poate fi singură un criteriu de discriminare, cu atît mai mult cu cît combinarea Fd cu urme de L ar putea da naștere unui fragment Fab cu un alt raport între cele două componente, decît în Fab ce rezultă din hidroliza moleculei intacte.

Cu această rezervă s-ar putea accepta ca o concluzie provizorie, care necesită verificări și pe alte căi experimentale, faptul că fragmentul Fd (Fd') conține grupări determinante comune cu L. Această constatare vine în sprijinul concepției lui M. Burnet [1] că regiunea variabilă a

lanțului L (N-terminală) [5] are o secvență identică cu aceea a fragmentului Fd. După M. Burnet, jumătatea C-terminală a lanțului L este controlată de un cistron stabil, iar jumătatea N-terminală are un control genetic complet diferit și identic cu al capătului N-terminal al lanțului H (fragmentul Fd). Zona de combinare apare deci ca o invaginație în care două fragmente Fd și cele două capete N-terminale ale lanțului L se atașază paralel sau în spirală. Aceste patru extremități N-terminale sînt identice și controlate, după Burnet, de un cistron specific labil care le reproduce de patru ori în molecula IgG. Este de notat, deci, că aranjamentul spațial al fragmentelor, propus de Burnet, se verifică prin datele noastre, care par să indice o înrudire antigenică între lanțul L și capătul N-terminal al lanțului H. Că fragmentul Fd mai conține însă și grupări determinante specifice rezultă din experiențele noastre în care am arătat că serul anti H absorbit cu L continuă să reacționeze cu fragmentul Fd.

Identitatea fragmentului Fd numai cu partea variabilă a lanțului L, presupusă de Burnet, este contrazisă însă de distribuția specificității alotipice și de greutatea moleculară foarte asemănătoare a fragmentului Fd și a lanțului L întreg (aproximativ 20 000). Experiențe preliminare [2], [5] arată că și fragmentul Fd, ca și lanțul L, poate fi divizat în două părți : jumătatea cu aminoacidul N-terminal este foarte variabilă și implicată în formarea zonei de combinare, iar cealaltă jumătate C-terminală este invariabilă. Aceste două porțiuni corespund jumătății variabile și celei invariabile demonstrate experimental pentru lanțul L, dar, după Z. Ovary [5], ele nu sînt identice.

Înrudirea antigenică constatată de noi s-ar putea baza pe existența unor grupări determinante comune situate pe porțiunea invariabilă atît a lanțului L cît și a fragmentului Fd. Faptul că lanțul L și fragmentul Fd au secvențe omologe în jurul primului rest de cisteină [2] poate constitui baza chimică a reacției încrucișate constatate de noi.

Datele noastre se adaugă și întăresc observațiile care au condus la concluzia că toate lanțurile imunoglobulinelor au evoluat dintr-un precursor comun, posibil cu dimensiunile unei jumătăți din lanțul L (G.M. 10 000).

Prezentată la redacție la 1 iunie 1968

Sectorul de imunochimie, Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România, București

BIBLIOGRAFIE

1. Burnet M., *A possible genetic basis for specific pattern in antibody*, Nature, **210**, *1308* (1966).
2. Cohen S., Milstein C., *Structure of antibody molecules*, Nature, **214**, 449 (1967).
3. Fleischman J. B., Porter R. R., Press E. M., *The arrangement of the polypeptide chains in γ-globulin*, Biochem. J., **88**, 220 (1963).
4. Gheție V., *The localization of 1-dimethyaminonaphthalene-5-sulfonic acid in Fd and Fd' fragments of rabbit IgG*, Rev. roum. biochim., **5**, 168 (1968).
5. Ovary Z., *The structure of various immunoglobulins and their biologic activities*, Ann. New York Acad. Sci., **129**, 716 (1966).
6. Porter R. R., *Chemical structure of γ-globulin and antibodies*, Brit. med. Bull., **19**, 197 (1963).

7. Roholt O. A., Radzimski G., Pressman D., *Specificity in the combination of Fd fragments with L chains to form hapten-binding sites*, J. Exp. Med., **123**, 921 (1966).
8. Smyth D. G., Utsumi S., *Structure at the hinge region in rabbit immunoglobulin G*, Nature, **216**, 332 (1967).
9. Utsumi S., Karush F., *Peptic fragmentation of rabbit γG immunoglobulin*, Biochemistry, **4**, 1766 (1965).
10. Utsumi S., Karush F., *The subunits of purified rabbit antibody*, Biochemistry, **3**, 1329 (1964).

THE IMMUNOELECTROPHORETIC CHARACTERIZATION OF POLYPEPTIDE CHAINS AND FRAGMENTS OF RABBIT IgG

SUMMARY

By immunodiffusion, using pigeon immune sera against rabbit L- and H-chains and guinea pig immune sera against rabbit IgG, subunits of IgG obtained by enzymatic hydrolysis (papain, pepsin) and by chemical reduction with β-mercaptoethanol (L-chain, H-chain, Fab, Fc, Fd′ and Fd fragments) were analysed.

It was established that the Fd (Fd′) fragment gives a partial identity reaction with the H-chain. Immunochemical differences between Fd and Fd′ fragments could not be distinguished. A reaction between anti L-chain serum and Fd (Fd′) fragment was recorded. Arguments in the favour of an antigenic relationship between Fd (Fd′) fragment and the L-chain were supplied.

ST. CERC. BIOCHIM. **11**, *4*, 391–398 (1968)

MODIFICĂRI ÎN ACTIVITATEA ADENOZINDEAMINAZEI DIN ERITROCITE ŞI FICAT ŞI A 5'-AMP-DEAMINAZEI SUB INFLUENŢA RADIAŢIILOR IONIZANTE

CONSTANŢA HALER, ASPAZIA BUSUIOC şi LEONID ABABEI

Rezumat. — S-a cercetat, la iepure şi şobolan, activitatea adenozindeaminazei în eritrocite şi în omogenatul de ficat de şobolan, normal şi iradiat, de asemenea 5'-AMP-deaminaza în omogenatul de ficat de şobolan, normal şi iradiat.

Sub influenţa radiaţiilor ionizante, activitatea adenozin-deaminazei în eritrocite şi ficat scade.

5'-AMP-deaminaza de asemenea este scăzută în ficatul iradiat.

Adenozindeaminaza din eritrocitele iradiate este reactivată de glutationul redus (conc. finală 0,01 mM).

Adenozindeaminaza şi 5'-AMP-deaminaza din eritrocite şi ficat sînt inhibate de clorura de mercur (conc. finală 0,01 mM) şi sulfatul de cupru (1 mM), atît la normal cît şi la animalul iradiat.

O protecţie a activităţii adenozindeaminazei eritrocitare cît şi din ficat, inhibată de iradiaţiile ionizante, a fost obţinută cu ajutorul cistaminei injectate *in vivo*. *In vitro*, o reactivare se obţine cu Mg^{++}, Ca^{++} şi glutation redus.

Conway şi colaboratorii [1] descriu, în ţesuturi şi sînge, o activitate adenozindeaminazică şi o deaminază a acidului adenilic. O serie de proprietăţi ale acestor enzime sînt asemănătoare [2], [3]. Schmidt [4] descrie primul prezenţa 5'-AMP-deaminazei în muşchiul de iepure, separînd această enzimă de adenozindeaminază. Abood şi Romanchek [5] au demonstrat existenţa activităţii deaminazei în fracţiunea microsomală din muşchi, creier, rinichi, ficat.

În lucrările referitoare la adenozindeaminază, Ababei şi Rapoport [6] arată rolul deosebit al acestei enzime în metabolismul intermediar al eritrocitelor. Studii numeroase au arătat că în aceste celule, metabolismul adenozinei şi inozinei este identic, în sensul că ambele nucleozide pot furniza substrat sub forma ribozo-1-fosfatului, pentru a fi mai departe metabolizat pe calea pentozo-fosforică şi apoi glicolitică din aceste celule, şi, în acest fel, pot servi ca substrat în furnizarea de energie pentru aceste celule [7], [8].

Pentru a putea fi mai departe metabolizată, adenozina trebuie să fie în prealabil desaminată şi transformată în inozină. În această reacţie intervine adenozindeaminaza. Existenţa unei nucleozidfosforilaze în eritrocit şi ficat a fost demonstrată [10].

Adenozina nu poate servi direct ca substrat în acţiunea acestei enzime în eritrocite, aşa cum arată Huennekens şi Gabrio [9]. Înainte a fi fosforilată, adenozina trebuie să fie desaminată. Prin metabolizarea restului de ribozo-1-fosfat, format de pe urma activităţii purinnucleozidfosforilazei, în eritrocite se ajunge pînă la acid lactic [10], [11].

Într-o serie de lucrări se arată că adenozindeaminaza este o enzimă sensibilă la hipoproteinemie şi că în tumori ea marchează o activitate scăzută [12].

Baer şi colaboratorii [13] arată că 5′-AMP şi adenozina, ca şi enzimele de desaminare a acestor componenţi, respectiv 5′-AMP-deaminaza şi adenozindeaminaza, au un rol important în reglarea circulaţiei coronariene.

Considerînd rolul important al acestor enzime în metabolismul intermediar celular, ne-am propus să studiem modificările lor după iradiere cu raze X, la iepuri în eritrocite, iar la şobolani în eritrocite şi ficat.

MATERIAL ŞI METODĂ

Experienţele au fost efectuate pe eritrocite de iepure şi şobolan şi pe omogenat de ficat de şobolan, normal şi iradiat cu 600 r.

Urmărind capacitatea de protecţie pentru enzimele studiate, am injectat cistamina la şobolani şi iepuri, 80 mg/kg/corp, cu 30 de minute înainte de iradiere.

Adenozindeaminaza a fost determinată în eritrocite şi omogenat de ficat după Denstedt şi Rubinstein [14], iar 5′-AMP-deaminaza după Kalkar [15].

Probele au fost incubate timp de 30 min la 38°C. Mediul de incubaţie a fost: tampon fosfat 0,05 M, pH 7,4, adenozina sau 5′-AMP 8.10^{-5} M, 0,1 ml hemolizat diluţie 1 : 10 sau 0,1 ml omogenat 0,1 g/ml şi soluţie izotonică de clorură de potasiu pînă la un volum de 2,5 ml.

După incubaţie, probele au fost precipitate cu acid percloric 10% şi lăsate la gheaţă 12—18 ore, la —5°C, apoi centrifugate la 4000 ture/min.

Activitatea enzimei a fost măsurată prin determinarea absorbţiei la 265 mμ, cu spectrofotometrul VSU 1, Carl Zeiss Jena.

REZULTATE

Din tabela 1 se vede că după o iradiere totală cu 600 r, adenozindeaminaza din eritrocitele de iepure marchează o scădere a activităţii cu peste 50%. Studiind efectul diferiţilor ioni asupra activităţii enzimei din aceste celule, s-a observat că nici unul nu influenţează semnificativ activitatea enzimei din eritrocitele iepurilor neiradiaţi, marcînd însă o activare semnificativă a activităţii enzimei la eritrocitele animale iradiate.

Citratul de sodiu, clorura de magneziu, sulfatul de zinc, fosfatul acid de potasiu activează enzima în cazul animalelor iradiate, dar nu şi la cele normale.

Glutationul redus stimulează atît enzima din eritrocitele animalelor normale cît şi la cele iradiate.

Clorura de mercur este un inhibitor în ambele cazuri.

Din tabela 2 se observă că modificările în activitatea adenozindeaminazei în eritrocitele de șobolan diferă de cele de la iepure. Și la șobolan activitatea adenozindeaminazei este mai scăzută după iradiere.

Tabela 1

Adenozindeaminaza în eritrocite de iepure μ mol/ml/h

	CONTROL	Citrat de sodiu 0,1 M	$MgCl_2$ 0,1 M	$ZnSO_4$ 5 mM	Glutation 0,01 mM	KH_2PO_4 8 mM	$HgCl_2$ 0,01 mM	$CaCl_2$ 0,01 M
NORMAL	24,6 ±2,0	24,32 ±3,48	25,6 ±3,84	24,4 ±3,44	27,12 ±2,0	24,24 ±1,24	3,16 ±3,08	25,76 ±3,88
	2,0	P > 0,1	P > 0,1	P > 0,1	P < 0,05	P > 0,1	P < 0,001	P > 0,1
	n = 14	n = 6	n = 6	n = 8	n = 8	n = 6	n = 7	n = 6
IRADIAT	11,52 ±2,04	18,32 ±1,68	15,32 ±2,68	16,56 ±1,76	17,96 ±1,6	15,72 ±1,36	0,68 ±0,4	14,08 ±3,12
	P < 0,001	P<0,001	P<0,02	P<0,01	P<0,001	P<0,01	P<0,001	P > 0,1
	n = 13	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8

Tabela 2

Adenozindeaminaza în eritrocite de șobolan μ mol/ml/h

	CONTROL	Citrat de sodiu 0,1 M	$MgCl_2$ 0,1 M	Glutation 0,01 mM	$ZnSO_4$ 5 mM	$HgCl_2$ 0,01 mM
NORMAL	14,72 ±2,04	15,32 ±1,52	21,40 ±3,56	14,88 ±0,56	12,28 ±2,81	3,72 ±0,01
		P > 0,1	P < 0,02	P > 0,1	P > 0,1	P < 0,001
	n = 6	n = 6	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5
IRADIAT	9,32 ±0,88	15,44 ±0,44	12,96 ±0,16	17,44 ±1,24	–	–
	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,01	P < 0,001		
	n = 6	n = 5	n = 4	n = 5		

La șobolanul normal, adenozindeaminaza din eritrocite este stimulată de clorura de magneziu. Glutationul redus, clorura de magneziu, citratul de sodiu refac activitatea enizmei la eritrocitele iradiate.

Activitatea enzimatică este mai mică la șobolan în comparație cu eritrocitul de iepure.

Adenozindeaminaza din ficatul de șobolan, spre deosebire de eritrocite, este puternic inhibată de ionul citrat (tabela 3). Inhibarea este mai marcată după iradiere. Ionii de Zn^{++}, Cu^{++}, Hg^{++} sînt de asemenea inhibitori. Numai ionul Mg^{++} în cazul adenozindeaminazei din ficat, reușește să activeze enzima după iradiere.

Tabela 3

Adenozindeaminaza în omogenatul de ficat de şobolan μ mol/g/h

	CONTROL	Citrat de sodiu 0,1 M	$MgCl_2$ 0,1 M	$ZnSO_4$ 5 mM	$HgCl_2$ 0,01mM	$CuSO_4$ 1 mM
NORMAL	48,4 ±1,4 n = 7	19,4 n = 1	43,9 ±3,6 P < 0,05 n = 6	23,9 ±3,5 P < 0,001 n = 4	7,1 n = 1	21,0 n = 1
IRADIAT	39,0 ±1,3 P < 0,001 n = 7	9,4 n = 1	47,7 ±4,0 P < 0,001 n = 6	22,8 ±1,4 P < 0,05 n = 4	8,0 n = 1	18,5 n = 1

Injectarea radioprotectorului cistamină reuşeşte să dea o protecţie semnificativă a activităţii enzimatice, în cazul adenozindeaminazei din eritrocitele de iepure (tabela 4).

Tabela 4

Adenozindeaminaza în eritrocite de iepure μ mol/ml/h

	NORMAL	IRADIAT
CONTROL	36,0	17,4
CISTAMINA	33,68	22,80

Aceeaşi protecţie se observă în cazul injectării şi la adenozindeaminaza din ficat (tabela 5).

Tabela 6 arată modificări în acţiunea 5′-AMP-deaminazei hepatice. După iradiere, această enzimă scade în activitate. Şi în cazul acestei enzime Mg^{++} activează enzima din omogenatul provenit de la animalele iradiate.

Tabela 5

Adenozindeaminaza în omogenatul de ficat de şobolan μ mol/g/h

	NORMAL	IRADIAT
CONTROL	48,4±1,4 n = 7	39,0±1,3 P < 0,001 n = 7
CISTAMINA	44,0 ± 3 P < 0,01 n = 5	44,1 ± 3 P < 0,05 n = 5
CISTAMINA + $MgCl_2$ 0,1 M	43,4 ± 4 P < 0,02 n = 5	46,1 ± 4 P < 0,01 n = 5

Tabela 6

5′-Amp-deaminaza în omogenatul de ficat de șobolan μ mol/g/h

	CONTROL	$MgCl_2$ 0,1 M	Citrat de sodiu 0,1 M	$ZnSO_4$ 5 mM	$HgCl_2$ 0,01 mM	$CuSO_4$ 1 mM
NORMAL	42,5 ±3,5	38,7 ±1,4	18,5	12,4 ±2,0	0	0
		P < 0,02		P < 0,001		
	n = 7	n = 7	n = 1	n = 4	n = 7	n = 7
IRADIAT	32,8 ±1,8	39,7 ±2,7	13,5	16,2 ±7,6	0	0
	P < 0,001	P < 0,001		P < 0,001		
	n = 8	n = 6	n = 1	n = 4	n = 8	n = 8

Zn^{++} produce o inhibiție mai puternică a enzimei din omogenatul normal decît cel iradiat. Astfel, în cazul enzimei din ficatul normal, de la valoarea de 42,5 enzima este inhibată la valoarea de 12,4, iar la cel iradiat de la valoarea 32,8 la 16,2.

Hg^{++} și Cu^{++} sînt inhibitori și pentru 5′-AMP-deaminază.

Cistamina protejează de inactivare și 5′-AMP-deaminaza din ficat, în iradiere, așa cum se observă în tabela 7.

Tabela 7

5′-Amp-deaminaza în omogenatul de ficat de șobolan μ mol/g/h

	NORMAL	IRADIAT
CONTROL	42,5±3,5	32,8±1,8
		P < 0,001
	n = 8	n = 8
CISTAMINA	34,3±1,1	38,1±3,7
	P<0,01	P<0,02
	n = 4	n = 4
CISTAMINA + $MgCl_2$ 0,1 M	30,0±2	37,6±2,4
	P<0,01	P<0,001
	n = 4	n = 4

DISCUȚII

Rezultatele prezentate arată că atît adenozindeaminaza cît și 5′-AMP-deaminaza sînt inhibate de către radiațiile ionizante. Scăderea procesului de desaminare prin inhibarea enzimei permite probabil, menținerea adenozinei și 5′-AMP la o concentrație mai înaltă, în vederea formării de energie. Este cunoscut că în iradiere calea glicolitică de formare a ATP-lui este inhibată. După Mandel [16], cantitatea de ATP în eritrocitele iradiate este scăzută ușor pînă la a 7-a zi de la iradiere, ca urmare a descreșterii fosforilărilor, fapt confirmat și de creșterea ADP-lui și de scăderea GDP, GTP, UDP pînă la a 7 zi de iradiere. Aceste date

sînt confirmate şi de lucrările lui Rappaport [17], care indică o netă diminuare a sintezei esterilor fosforici ai hexozelor, pentozelor şi triozelor.

Faptul că după iradiere adenozindeaminaza şi 5'-AMP-deaminaza sînt inhibate, arată existenţa unor mecanisme de protecţie celulară a substanţelor adeninnucleotidice, în iradiere.

Adenozindeaminaza, enzimă deosebit de importantă pentru eritrocite, este reactivată cu o serie de ioni bivalenţi care la eritrocitele de iepuri normali nu influenţează activitatea enzimei. Găsim însă o activare a enzimei din eritrocitele de şobolan normal în prezenţa Mg^{++} .Enzima din eritrocitele iradiate de iepure, şobolan şi din omogenatul de ficat de şobolan este reactivată de Mg^{++}.

De asemenea 5'-AMP-deaminaza din omogenatul de ficat iradiat este reactivată de Mg^{++}.

Constatarea acestor fapte ridică problema unor modificări în permeabilitatea pentru aceşti ioni a membranelor celulare, atît la eritrocite cît şi în celula hepatică, de asemenea problema existenţei unor legături labile enzimă-metal.

Zn^{++} este inhibitor pentru o serie de enzime, inclusiv pentru activitatea adenozindeaminazei şi 5'-AMP-deaminazei din ficat. Aceste date sînt în acord cu acelea ale lui Lee [3], dar nu şi cu acelea ale lui Nikiforuk şi Colowick [2], care nu găsesc inhibiţie la acest ion. În cazul eritrocitelor de iepure, la concentraţia folosită 5mM, nici noi nu am găsit inhibiţie la acest ion.

Considerînd existenţa modificărilor de permeabilitate, se poate presupune că Zn^{++} părăseşte celula, efect asemănător cu cel observat în cazul Ca^{++}, Mg^{++} (în acest sens lucrări sînt în curs). În aceste condiţii, concentraţia la care ionii de Zn^{++} pot da o inhibiţie identică ca la normal, trebuie să crească. Rezultatele prezentate în tabela 6 demonstrează acest mecanism.

Efectul anionilor asupra acestor enzime a fost studiat de asemenea. Citratul activează adenozindeaminaza din eritrocitele iradiate de iepure şi şobolan. Adenozindeaminaza şi 5'-AMP-deaminaza din omogenatul de ficat de şobolan normal şi iradiat sînt inhibate de citratul de sodiu.

Sensibilitatea enzimei la ionii de Hg^{++} şi Cu^{++} sugerează că adenozindeaminaza şi 5'-AMP-deaminaza sînt SH-enzime, grupele sulfhidrilice fiind esenţiale pentru activitatea enzimatică.

Diminuarea activităţii acestor enzime în ţesuturile studiate, în urma acţiunii radiaţiilor ionizante, contribuie la explicarea tulburărilor observate de Mandel [16] în metabolismul nucleotidelor în boala de iradiaţie, în eritrocite, şi de asemenea explică — dacă nu total, cel puţin în parte — diminuarea capacităţii glicolitice şi oxidative a eritrocitelor [18], [19] şi a precursorilor acestora, a reticulocitelor.

CONCLUZII

Activitatea adenozindeaminazei în eritrocitele de iepure şi şobolan şi în omogenatul de ficat, de asemenea a 5'-AMP-deaminazei în omogenatul de ficat de şobolan, scade la animalele iradiate.

Activitatea enzimelor după iradiere, în ce privește comportamentul față de anumiți ioni metalici, ca Mg^{++}, Ca^{++}, Zn^{++} și citratul de sodiu, se modifică.

Tulburările observate arată că în urma iradierii apar modificări în sinteza proteinenzimelor studiate, precum și modificări de permeabilitate celulară.

Efectul activator al ionilor menționați, în special Mg^{++}, Ca^{++}, și al glutationului redus, pentru enzimele provenite din celulele animalelor iradiate,pune problema unui studiu mai amănunțit, al metabolismului acestora și a participării lor la etiopatogenia bolii de iradiație.

Prezentată la redacție la 20 februarie 1968

Laboratorul de biochimie, IMF Iași
și Institutul de cercetări medicale
al Academiei Republicii Socialiste România,
Filiala Iași

BIBLIOGRAFIE

1. E. R. Conway, R. Cooke, Biochem. J., **33**, 457 (1939).
2. G. Nikiforuk, S. P. Colowich, J. Biol. Chem., **219**, 119 (1956).
3. Y. P. Lee, J. Biol. Chem., **227**, 987 (1957).
4. G. Schmidt, Hoppe-Seyl Z., **179**, 243 (1928).
5. L. G. Abood, L. Romancheck, Exptl. Cell. Research, **8**, 459 (1955).
6. L. Ababei, S. Rapoport, Acta biol. med. germ., **6**, 288 (1961).
7. E. J. Harris, T. A. Prankerd, J. Gen. Physiol., **41**, 197 (1958).
8. B. W. Gabrio, F. M. Huennekens, Biochem. Biophys. Acta, **18**, 585 (1955).
9. F. M. Huennekens, B. W. Gabrio, J. Biol. Chem., **221**, 971 (1956).
10. Z. Dische, în *Phosphorus Metabolism*, W. D. McElroy, B. Glass eds., John Hopkins Press, Baltimore, Maryland.
11. B. A. Lowy, E. R. Jaffee, G. Vanderhoff, L. Crook, I. M. London, J. Biol. Chem., **230**, 409 (1958).
12. Y. Nakata, M. Itoh, K. Nakata, J. Biochem., **55**, 5 (1964).
13. H. P. Baer, G. I. Drummond, E. L. Duncan, Molecular pharmacology, **2**, *1* (1966).
14. O. Denstedt, D. Rubinstein, Canad. J. Biochem. Phys., **34**, 927 (1956).
15. H. M. Kalkar, J. Biol. Chem., **167**, 429, 461 (1947).
16. P. Chambon, H. Karon, P. Mandel, Bull. Soc. Chim. biol., *1*, 43 (1961).
17. D. A. Rappaport, B. W. Swell, Nature, **184**, 846 (1959).
18. M. Filip, L. Ababei, Fiziol. norm. pat., **12**, 6 (1966).
19. L. Ababei, M. Filip, C. Haler, M. Moisiu, Folia hematologica, (sub tipar).

CHANGES IN THE ACTIVITY OF ADENOSINE DEAMINASE IN ERYTHROCYTES AND IN LIVER AND OF 5′ AMP DEAMINASE UNDER THE INFLUENCE OF IONIZING RADIATIONS

SUMMARY

The authors studied in normal and irradiated rabbits and in rats the activity of adenosine deaminase in erythrocytes and in homogenates of liver. It was also studied the 5′ AMP deaminase in liver homogenates of normal and irradiated animals.

It was found that under the influence of ionizing radiations, the activity of adenosine deaminase in erythrocytes and in liver decreases. The 5′ AMP deaminase activity also diminished in the irradiated liver.

The adenosine deaminase in erythrocytes can be reactivated by reduced glutathione, final concentration 0.01 mM.

The deaminase from erythrocytes and from liver, just as the 5'AMP deaminase, are inhibited by mercuric chloride in a final concentration of 0.01 mM and by copper sulphate in a final concentration of 1 mM, not only in irradiated but also in normal animals.

The activity of erythrocytes and liver adenosine deaminase which is inhibited by ionizing radiations, could be preserved by cystamine administrated *in vivo*. *In vitro* a reactivation with Mg^{++}, Ca^{++}, and reduced glutathione may be obtained.

ST. CERC. BIOCHIM. **11**, 4, 399–405 (1968)

ACTIVITATEA RIBONUCLEAZELOR DIN MUȘCHIUL SARTORIUS DE BROASCĂ ÎN STARE NORMALĂ ȘI ÎN MIOTONIA EXPERIMENTALĂ

CORINA IORDACHE

Rezumat. — S-a pus în evidență, în tampon fosfat-citrat, la 37°C, activitatea ribonucleazică a mușchiului sartorius de broască. S-a constatat existența a două RN-aze acide (pH = 4,0 și 6,0) și a unei RN-aze „neutre" (pH = 7,0). Cele trei RN-aze au energii de activare diferite ; termostabilă este numai RN-aza de la pH = 4,0.

În miotonia experimentală, produsă prin acțiunea acidului 2,4-diclorfenoxiacetic (2,4-D), activitatea ribonucleazică „acidă" crește. Ionii de calciu au o acțiune inhibitoare asupra activității RN-azice din mușchiul sartorius de broască. Această activitate este mai marcată în cazul mușchiului miotonic.

Într-o lucrare anterioară [1] am arătat că mușchiul sartorius de broască poate fi folosit ca model experimental, *in vitro*, pentru cercetarea biochimismului muscular, în miotonia produsă prin acțiunea acidului 2,4-diclorfenoxiacetic (2, 4-D). Folosind acest model, am constatat că scindarea fosfocreatinei musculare, produsă de 2,4-D, poate fi redusă sau chiar anulată prin intervenția acidului ribonucleic (ARN).

În formularea ipotezei de lucru care a stat la baza lucrării amintite am avut în vedere unele date din literatură [2] care menționau participarea posibilă, la procesul de fosforilare oxidativă, a produșilor rezultați din fosforoliza ARN-ului în urma acțiunii ribonucleazei.

Cum în lucrarea anterioară [1] acest aspect nu a fost cercetat, am considerat că era interesant și totodată necesar să se urmărească activitatea ribonucleazică (RN-azică) a mușchiului, în condițiile miotoniei experimentale produse prin intermediul acidului 2,4-D. Aceasta cu atît mai mult cu cît se știe că 2,4-D produce la plante creșterea activității RN-azice [3]. De altfel, o creștere a activității unor enzime, printre care se enumeră și RN-aza [4] s-a pus în evidență și în unele distrofii musculare, produse experimental prin avitaminoză E.

În lucrarea de față am expus rezultatele referitoare la activitatea ribonucleazică a mușchiului normal și tratat cu 2,4-D, precum și la termostabilitatea enzimei și acțiunea ionilor de calciu asupra activității ei.

MATERIAL ȘI METODE

S-au folosit mușchi sartorius proveniți de la broaște (*Rana ridibunda*) cărora măduva spinării li s-a distrus cu 2—3 ore înaintea izolării lor. Mușchii au fost disecați cu atenție, pentru evitarea oricărei lezări.

Toți mușchii sartorius izolați de la unul din picioare au fost imersați în soluție Ringer [5], iar cei izolați de la celălalt picior — în soluție Ringer cu adaos de 2,4-D (5 mM). Ambele soluții au fost barbotate cu un curent de oxigen.

După 1,30 ore, mușchii s-au scos din soluții, s-au șters ușor pe hîrtie de filtru, s-au cîntărit și s-au omogenizat într-un omogenizator tip Potter, cu apă distilată, la rece (1 : 10) [6], [7]. Extractele s-au lăsat o oră la frigider, după care s-au centrifugat la rece, la 5 500 rot/min, timp de 20 min.

Determinarea activității ribonucleazice a extractelor musculare s-a făcut, în general, după metoda dată de Epstein [4], cu următoarele modificări : la 1 ml tampon fosfat de sodiu — acid citric (McIlvaine) s-au adăugat 0,5 ml extract muscular. După 10 min de ședere la 37°C s-a adăugat 0,5 ml ARN 0,4%. Amestecul s-a incubat la 37°C, timp de 2 ore. Reacția s-a oprit cu 1 ml acetat de uranil 0,25% în acid percloric 10%, la rece. După 30 min. toate probele, inclusiv martorii, s-au centrifugat la rece, timp de 5 min, la 5 500 rot/min. Din supernatant 0,5 ml s-a adus la 5 ml cu apă, iar absorbția oligonucleotidelor acidosolubile s-a citit la un spectrofotometru VSU—1, la 260 mμ, cuva 0,499.

S-a utilizat sarea de sodiu a acidului 2,4-diclorfenoxiacetic (2,4-D). H_2O p.a. (Pal Chemicals Limited, London) și acid nucleic (*acidum nucleinicum aus Hefe* — p.a. Austranal).

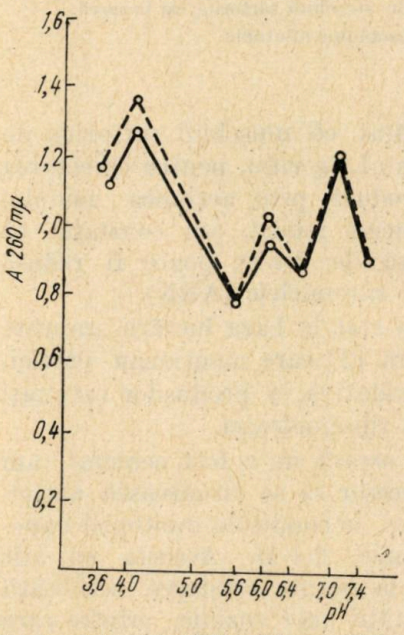


Fig. 1. — Activitatea RN-azică a mușchilor sartorius de broască normali, simetrici.
——— extract de mușchi provenit de la un picior;
– – – extract de mușchi provenit de la celălalt picior.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Ribonucleazele din mușchiul sartorius de broască normal. Din literatura consultată reiese că pînă în prezent activitatea RN-azică a mușchiului sartorius de broască nu a fost determinată, deși acest mușchi a fost folosit în cercetarea sintezei proteice proprii sub efectul insulinei și al contracției musculare [8]. În consecință am determinat activitatea RN-azică a mușchilor sartorius de broască, simetrici, normali (fig. 1). Din examinarea figurii rezultă că această activitate prezintă la trei maxime, plasate trei valori de pH diferite : 4,0 ; 6,0 și 7,0.

Activitatea RN-azică a acestui mușchi, provenit de la un animal cu sînge rece, nu a putut fi comparată cu alte date similare din literatură

decît în mod relativ deoarece în cazul ţesutului muscular există doar cîteva lucrări care se referă la activitatea enzimatică a muşchiului provenit de la animale cu sînge cald (şobolan şi şoarece) [6], [7]. Epstein [4] a determinat activitatea RN-azică a muşchilor scheletici de iepure normal şi distrofic, în tampon glicocol şi a constatat existenţa a două maxime, la pH = 5,6 şi 7,5. Mai recent, W. Meyer şi C. Miller [9] au comunicat existenţa unei noi ribonucleaze intracelulare în muşchiul de iepure, cu pH optim = 8,5.

Este interesantă constatarea noastră că, spre deosebire de muşchiul de iepure sau de alte organe ale mamiferelor (pancreas, ficat, splină), unde în general există o RN-ază „acidă" şi una „alcalină", în muşchiul sartorius de broască apar două ribonucleaze „acide" şi una „neutră". De altfel, existenţa celor trei maxime din figura 1 a fost verificată şi prin determinările de activitate făcute în alte sisteme tampon, cum sînt acetat-acid acetic (0,2 M) sau Tris (oximetyl)-amino-metan-HCl (0,2 M), şi în care s-au reprodus piscurile respective. Nu poate fi vorba deci de vreo activare a unei RN-aze „latente", cauzată de existenţa citratului [10] în sistemul tampon folosit de noi. Nu este exclus însă ca depolimerizarea ARN-ului să fie manifestarea existenţei unor proteine cu greutate moleculară mică, prezente în extractul muscular, sau a unor fosfodiesteraze. Se impune deci izolarea, purificarea acestor RN-aze şi urmărirea activităţii lor enzimatice, ceea ce constituie preocuparea noastră în momentul de faţă.

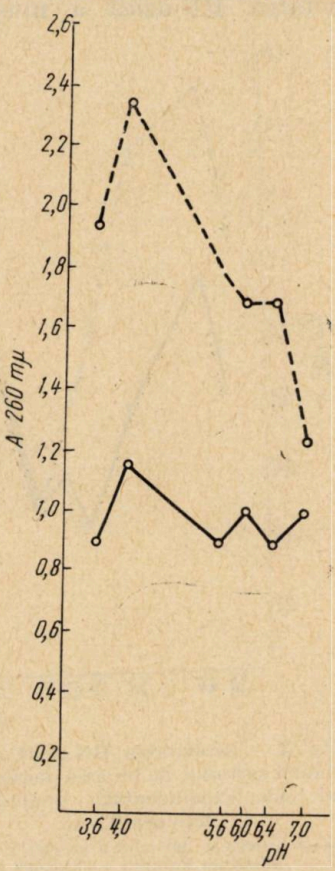


Fig. 2. — Activitatea RN-azică a muşchiului sartorius de broască la 37°C şi 47°C.
—— activitatea RN-azică la 37°C;
– – – activitatea RN-azică la 47°C.

Efectul căldurii asupra activităţii ribonucleazelor din muşchiul sartorius de broască normal. În ceea ce priveşte termostabilitatea RN-azelor din muşchiul sartorius de broască, am determinat în paralel, pe acelaşi extract în tampon fosfat-acid citric şi la aceleaşi valori de pH, activitatea RN-azică la 37° şi la 47°C. După cum se observă din figura 2, la 47°C activitatea RN-azică a muşchiului este mult crescută, la toate valorile de pH. Se păstrează numai punctul de activitate maximă de la pH = 4,0 şi dispar cele două maxime de la pH = 6,0 şi 7,0 care existau la 37°C.

Calculele făcute privitor la coeficientul de temperatură (Q_{10}) şi la energia de activare (E) pentru cele trei valori de pH (4,0 ; 6,0 şi 7,0) au confirmat existenţa celor trei RN-aze, prin faptul că acestea au energii de activare diferite, şi anume :

la pH = 4,0 Q_{10} = 2,04 E = 14.024 cal/mol,
pH = 6,0 Q_{10} = 1,70 E = 10.435 cal/mol,
pH = 7,0 Q_{10} = 1,25 E = 4.384 cal/mol.

Efectul obținut prin determinarea activității RN-azelor la 47°C pune în evidență și pentru RN-azele din mușchiul sartorius de broască cunoscuta termostabilitate maximă a RN-azelor „acide". Acest efect se deosebește însă de cel obținut în cazul ficatului animalelor cu sînge cald [11], unde RN-aza „alcalină" este termostabilă, iar cea „acidă" este termolabilă.

În orice caz, rezultatele obținute contribuie la stabilirea diferențierilor care există între aceste nucleaze [12] și constituie premisele unei cercetări ulterioare.

Acțiunea acidului 2,4-diclorfenoxiacetic (2,4-D) asupra activității ribonucleazelor din mușchiul sartorius de broască. În figura 3 redăm activitatea RN-azică a mușchiului normal și tratat cu 2,4-D (5 mM), timp de 1,30 ore. După cum se constată din examinarea curbelor înscrise în această figură 2,4-D produce o creștere a activității RN-azice a mușchiului, similară ca efect cu cea observată în distrofiile musculare produse prin avitaminoză *E* [4].

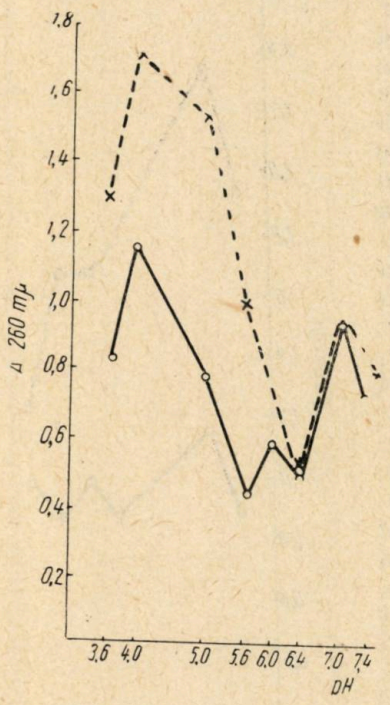


Fig. 3. — Activitatea RN-azică a mușchiului sartorius de broască normal și în miotonia experimentală produsă prin acțiunea 2,4-D.

——— activitatea RN-azică a mușchiului normal;
– – – activitatea RN-azică a mușchiului tratat cu 2,4-D 5 mM, 1,30 ore.

Creșterea activității RN-azice a mușchiului în miotonia experimentală produsă de 2,4-D se manifestă cu deosebire în domeniul RN-azelor „acide" (pH = 4,0 și 6,0); activitatea celei „neutre" (pH = 7,0) rămîne practic identică cu aceea a mușchiului normal. Din cauza creșterii activității, piscul obținut în cazul mușchiului normal la pH = 6,0 nu mai apare.

Deoarece în cazul țesutului vegetal R.O. Morris [13] a constatat că 2,4-D ar avea o anumită acțiune asupra sintezei proteice din țesut, iar N.A. Satarova [14] că ar duce la acumularea acizilor nucleici, nu este exclus ca schimbările metabolice care survin în urma acțiunii acestei substanțe asupra mușchiului să se traducă deocamdată prin activarea RN-azelor „acide".

Efectul ionilor de calciu asupra activității ribonucleazelor din mușchiul sartorius normal sau tratat cu 2,4-D. Cercetarea acțiunii ionilor de calciu asupra activității RN-azelor din mușchiul sartorius de broască normal și din cel tratat cu 2,4-D a fost impusă de constatarea că viteza de acumulare a calciului în veziculele reticulului sarcoplasmatic al mușchiului miotonic este redusă [15].

În consecință, am determinat activitatea RN-azelor din mușchiul normal și din tratat cu 2,4-D (5 mM), în absența și în prezența ionilor de calciu în concentrație de $0{,}5 \cdot 10^{-3}$ M. În figura 4 este redată procen-

tual activitatea enzimatică, considerînd ca 100% activitatea extractului de mușchi, normal sau tratat cu 2,4-D, în absența calciului. După cum se poate observa din această figură, calciul produce în general o inhibare a activității RN-azice la valorile de pH considerate, această inhibare fiind mai evidentă pentru mușchiul tratat cu 2,4-D.

Se știe că ionii de calciu au o acțiune inhibitoare asupra activității RN-azice [4], [12]. Faptul constatat de noi că la mușchiul tratat cu 2,4-D această inhibiție este mai marcată, cu toate că 2,4-D produce o creștere a activității enzimatice, ar putea duce la explicarea unor constatări din literatură, și anume a cauzei pentru care viteza de acumulare a calciului în veziculele reticulului sarcoplasmatic este redusă, în timp ce în afara veziculelor concentrația de calciu liber este crescută. Într-adevăr, se știe că RN-aza conține în molecula sa grupări imidazolice [16], [17]. Participarea acestor grupări din molecula RN-azei la reținerea ionilor de calciu — fapt care duce la reducerea vitezei lor de acumulare și la inhibiția RN-azei — este plauzibilă, dacă se iau în considerație datele recente publicate de Yu și colaboratori [18] privind intervenția imidazolului în reținerea calciului la nivelul reticulului sarcoplasmatic. În acest sens reține atenția și punerea în evidență, de către Rodionova și Shapot [19], a unui ARN deosebit în membranele reticulului endoplasmatic, care pare să fie implicat în sinteza proteică din membrana structurală. Sub acest aspect, cercetarea ulterioară mai amănunțită a localizării RN-azelor în formațiunile structurale intracelulare din mușchi și în diferite condiții fiziologice ale mușchiului, credem, ar putea evidenția, unele aspecte inedite privind intervenția ionilor de calciu în biochimismul muscular.

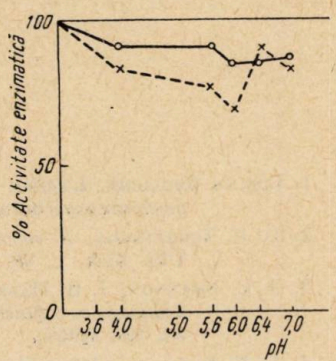


Fig. 4. — Activitatea RN-azică a mușchiului sartorius de broască normal și în miotonia experimentală produsă prin acțiunea 2,4-D 5 mM, sub acțiunea ionilor de calciu ($0{,}5 \cdot 10^{-3}$ M).

——— activitatea RN-azică a mușchiului normal în prezența ionilor de calciu;
– – – activitatea RN-azică a mușchiului tratat cu 2,4-D în prezența ionilor de calciu.

CONCLUZII

1. Mușchiul sartorius de broască prezintă activitate ribonucleazică cu maxime care se plasează la pH = 4,0; 6,0 și 7,0, în tampon de fosfat-acid citric, la 37°C.

2. La 47°C, activitatea RN-azică a mușchiului sartorius de broască este, în general, crescută, iar energiile de activare a celor trei RN-aze sînt diferite. Este termostabilă numai RN-aza cu pH optim = 4,0, care își păstrează maximul de activitate.

3. Acidul 2,4-D intensifică activitatea RN-azelor „acide" de la pH = 4,0 și 6,0.

4. Ionii de calciu au, în general, o acțiune inhibitoare asupra activității RN-azelor din mușchiul sartorius de broască. Inhibiția este mai accentuată în cazul mușchiului tratat cu 2,4-D.

5. S-a verificat în acest fel ipoteza că în miotonia experimentală produsă de 2,4-D activitatea RN-azei musculare crește.

Mulțumesc lui Traian Benția pentru asistența tehnică.

Prezentat la redacție la 20 mai 1968

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. Corina Iordache, *L'action de l'ARN sur le taux de la phosphocréatine musculaire dans la myotonie expérimentale*, Rev. roum. biochim., **4**, 4, 287 (1967).
2. O. P. Tchepinoga, *K voprosu o mehanizme uchiastija nukleinovyh kislot v dykhanie tkanjah* Ukr. bioh. j., **30**, 585 (1958).
3. J. C. Shannon, J. B. Hanson, C. M. Wilson, *Ribonuclease levels in the mesocotyl tissue of Zea mays as a function of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid application*, Plant. Physiol., **39**, 804 (1964).
4. S. F. Epstein, *Aktivnosti ribonukleazy mychtsy*, Ukr. bioh. j., **36**, 855 (1964).
5. G. Marechal, G. Beckers-Bleukx, *Adenosine triphosphate and phosphoryl-creatine breakdown in resting and stimulated muscles after treatment with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene*, Biochem. Z., **345**, 286 (1966).
6. J. S. Roth, S. W. Milstein, *Ribonuclease, A new assay method with ^{32}P-labeled yeast ribonucleic acid*, J. Biol. Chem., **196**, 489 (1952).
7. K. A. O. Ellem, J. S. Colter, J. Kuhn, *Ribonucleases of mouse tissues and of the Ehrlich ascites tumour*, Nature, **184**, 984 (1959).
8. S. Karpatkin, A. Samuels, *Effect of insulin and muscle contraction on protein synthesis in frog sartorius*, Arch. Biochem. Biophys, **121**, 695 (1967).
9. W. L. Meyer, L. Miller, *A novel intracellular ribonuclease of skeletal muscle*, VII Intern Congress Biochem., Tokyo, 1967, Abstracts V, p. 928.
10. L. Josefsson, S. Lagerstedt, *Characterization of ribonuclease and determination of its activity*, In Methods of biochemical analysis, edited by D. Glick, Interscience Publishers, New York, London, 1962, vol. 9, p. 39.
11. J. S. Roth, *Ribonuclease. VI. Partial purification and characterization of ribonucleases of rat liver mitochondria*, J. Biol. Chem., **227**, 591 (1957).
12. E. F. Terroine, *Le métabolisme nucléique*, C.N.R.S., Paris, 1960, p. 254.
13. R. O. Morris, *Changes in pea root proteins associated with tissue differentiation. The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid*, Biochim. Biophys. Acta, **127**, 273 (1966).
14. N. A. Satarova, *Vlijanie nukleinovyh kislot, adenina i 2,4-D na rost kultury tkani gladiolusa*, Fiziol. Rastenii, **8**, 309 (1961).
15. W. Stein, *Experimentelle Myotonie*, în E. Kuhn, *Progressive Muskeldystrophie, Myotonie, Myasthenie*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1966, p. 307.
16. C. A. Ross, A. P. Mathias, B. R. Rubin, *The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease, 6. Kinetic and spectrophotometric investigation of the interaction of the enzyme with inhibitors and p-nitrophenyl acetate*, Biochem. J., **85**, 145 (1962).
17. W. H. Stein, *The structure and the activity of ribonuclease*, Israel J. Med. Sci., **1**, 1229 (1965).
18. B. P. Yu, E. J. Masoro, F. D. De Martinis, *Imidazole and sequestration of calcium ions by sarcoplasmic reticulum*, Nature, **216**, 822 (1967).
19. N. P. Rodionova, V. S. Shapot, *Ribonucleic acids of the endoplasmic reticulum of animal cells*, Biochim. Biophys. Acta, **129**, 206 (1966).

THE ACTIVITY OF RIBONUCLEASES FROM FROG SARTORIUS MUSCLE IN NORMAL STATE AND IN MYOTONIA EXPERIMENTALIS

SUMMARY

In phosphate-citrate buffer, at 37°C, the ribonuclease activity of the frog sartorius muscle was demonstrated. The existence of two acid RN-ases (pH = 4.0 and 6.0) and of one "neutral" RN-ase (pH = 7.0) was established. The three RN-ases have various activation energies; only RN-ase of pH = 4.0 is thermostable.

In myotonia experimentalis produced by the action of 2,4 dichlorophenoxiacetic acid (2,4-D) the activity of the "acid" ribonuclease increases. The calcium ions have an inhibitory action on the RN-ase activity of the frog sartorius muscle. This activity is more marked in the case of the myotonic muscle.

ST. CERC. BIOCHIM. 11, 4, 407–411 (1968)

STUDIUL CROMATOGRAFIC AL AMINOACIZILOR DIN HEMOLIMFA LARVELOR DE *AGROTIS SEGETUM* SCHIFF ŞI INFLUENŢA TRATAMENTULUI CU DETOX 25

ADELA ŞTEFAN şi MARIA IONESCU

Rezumat. — Larvele de *Agrotis segetum* Schiff, la începutul ultimului stadiu de dezvoltare, hrănite cu varză tratată, au fost active pînă în momentul sacrificării. Larvele hrănite însă cu varză tratată cu Detox 25 emulsionabil, în concentraţie de 0,75%, au manifestat din primele 4–6 ore simptome de paralizie, iar după 20 de ore 80 % nu se mai hrăneau.

Prin analiza cromatografică, în hemolimfa larvelor martor (hrănite cu varză netratată) şi a larvelor hrănite cu varză tratată s-au găsit aminoacizii alanină, acid aspartic, glutamic, histidină, glutamină, glicocol, leucină, lizină, fenilalanină, prolină, serină, treonină, tirozină şi valină. La larvele hrănite cu varză tratată, nivelul total al aminoacizilor a scăzut faţă de cel al larvelor hrănite cu varză netratată, de la 1784 la 1429 mg la 100 ml hemolimfă.

Una din caracteristicile principale ale clasei *Insecta* este conţinutul lor bogat în aminoacizi liberi din hemolimfă. Această particularitate prezintă un mare interes pentru studiul metabolismului acestor substanţe. Concentraţia în aminoacizi din hemolimfa de insecte este de 10 — 40 de ori mai mare decît aceea a sîngelui din oricare grup de animale. Pe cînd la mamifere ea nu depăşeşte 0,5 g la litru de plasmă, la insecte atinge 5 — 20 g la litru de hemolimfă.

Identificarea aminoacizilor liberi s-a făcut de puţină vreme, iar analizele şi dozările cantitative s-au făcut foarte sporadic.

Datele din literatură arată că o serie de cercetători ca : Levenbook [7], Drilhon [5], Auclair şi Dubreuil [2], Duchateau şi Florkin [6] au găsit în hemolimfa insectelor aparţinînd la ordine diferite între 13 — 15 aminoacizi liberi. În ceea ce priveşte concentraţiile în diferiţi aminoacizi, cercetările lui Duchateau şi Florkin [6] au arătat că în ordinele mai primitive, *Odonata*, *Orthoptera*, ele au în general valori mai scăzute, pe cînd la *Coleoptera* şi *Lepidoptera* au valori mai ridicate. Nu s-a cercetat însă pînă în prezent conţinutul în aminoacizi liberi din hemolimfa de *Agrotis segetum*, insectă ce face mari ravagii în culturile agricole. De asemenea, nu s-a cercetat încă influenţa pe care tratamentele cu insecticide o au asupra aminoacizilor din hemolimfa insectelor, respectiv nici de la *Agrotis segetum*.

Deoarece aminoacizii ocupă un loc important în chimismul organismului viu, am considerat că cercetările legate de conţinutul aminoacizilor din hemolimfa de insecte sînt foarte importante pentru elucidarea unor probleme legate de manifestările de intoxicaţie şi de rezistenţa la intoxicaţie a insectelor.

În cercetările efectuate de noi am căutat să cunoaştem compoziţia calitativă şi cantitatea de aminoacizi din hemolimfa larvelor de *Agrotis segetum* Schiff, la începutul ultimului stadiu de dezvoltare, cînd larvele consumă cea mai mare cantitate de hrană şi produc daunele cele mai mari.

MATERIAL ŞI METODĂ

Experienţele s-au efectuat pe larve de *Agrotis segetum*, aflate la începutul ultimului stadiu de dezvoltare. Creşterea larvelor s-a făcut în laborator, din larve aduse din cîmp de la Ferma horticolă Grozăveşti. Temperatura din laborator a variat între 19 şi 31°C. Larvele s-au plasat cîte una în cristalizor tapisat cu hîrtie de filtru umectată la fiecare 2 zile cu cîte o picătură de apă. În toată perioada dezvoltării, larvele au fost hrănite cu frunze de varză. Larvele aduse din cîmp, în număr de 60, s-au transformat în crisalide. Din crisalide au apărut fluturi. Imediat după apariţie, fluturii au fost dispuşi în perechi, în cristalizoare. În total au fost 16 perechi, hrănite cu sirop de zahăr (cîte 1 — 2 picături pe o rondelă de pergament). Din ouăle depuse de aceşti fluturi au apărut larvele (140 exemplare) pe care le-am folosit ca material biotic în cercetările noastre.

S-a luat un lot de 20 larve ca martor. Acestea au fost hrănite cu frunze de varză netratate. Alte loturi de cîte 20 de larve, în cinci repetiţii, au fost hrănite cu frunză de varză tratată cu Detox 25 emulsionabil, folosit în concentraţie de 0,75%, în doză corespunzătoare la 1 500 litri la hectar pe cultura de varză (ca şi în producţie). Larvele hrănite cu varză tratată au manifestat stări de paralizie după cîteva ore (4 — 6 ore). După 20 de ore de la începutul experienţei s-au luat probe de hemolimfă, atît de la larvele martor cît şi de la cele care au consumat frunze de varză tratată. Hemolimfa a fost obţinută perforînd tegumentul cu un vîrf ascuţit de sticlă şi aspirînd cu o micropipetă gradată pînă la 1 ml. Apoi hemolimfa a fost prelucrată după tehnica descrisă de Auclair şi Dubreuil [1], cu unele modificări. Pentru precipitarea proteinelor, hemolimfa a fost diluată de 10 ori cu alcool 95%, iar precipitatul s-a separat prin centrifugare. Extracţia s-a repetat de 3 ori pe precipitat, fracţiunile alcoolice unite au fost evaporate la sec pe baie de apă, la temperatura de 20 — 40°C (în loc de presiune redusă). Reziduul a fost luat cu 1 ml alcool izopropilic 10% (în loc de apă distilată).

Analiza calitativă a aminoacizilor s-a făcut prin metoda cromatografiei unidimensionale. În acest scop, probe de cîte 25 µl limfă s-au trecut pe hîrtie Whatmann nr. 1, care apoi a fost irigată cu amestec de alcool butilic-acid acetic-apă (4 :1 :5), ascendent, unidimensional, de 3 ori succesiv. Revelarea spoturilor s-a făcut cu ninhidrină 0,3% în alcool etilic 95%, iar dezvoltarea culorii a avut loc la temperatura camerei şi

la întuneric. Pentru identificarea aminoacizilor s-au folosit probe de aminoacizi martor, aplicate pe aceeaşi hîrtie cromatografică, cîte 10μl de soluţie 0,01 M.

Dozarea cantitativă a aminoacizilor s-a efectuat după separarea lor prin cromatografia pe hîrtie. După 16 ore de la pulverizarea cu ninhidrină, spoturile individuale ale aminoacizilor, precum şi martorii respectivi, s-au decupat, s-au introdus în eprubete şi s-au transformat într-un complex cu cadmiu [2], care a fost ulterior eluat cu 3 ml alcool metilic concentrat. Eprubetele s-au agitat puternic, pentru a se face o eluţie perfectă a complexului, hîrtiile trebuind să rămînă complet albe. După 10 min de agitare, soluţiile s-au colorimetrat. Calculul concentraţiilor s-a făcut în funcţie de extincţiile aminoacizilor martor de pe aceeaşi cromatogramă.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din observaţiile făcute de noi au rezultat următoarele :

Larvele de *Agrotis segetum*, aflate la începutul ultimului stadiu de dezvoltare şi hrănite cu varză netratată (martor), au fost active, continuînd să se hrănească pînă în momentul sacrificării. Larvele hrănite cu varză tratată cu Detox 25, în concentraţie de 0,75%, au manifestat din primele 4 — 6 ore simptome de paralizie, mişcări reduse, iar după 20 de ore 80% din ele nu se mai hrăneau. Prin analiza cromatografică unidimensională, în hemolimfa larvelor s-au găsit 14 aminoacizi liberi : alanina, acidul aspartic, glutamina, histidina, acidul glutamic, glicocolul, leucina, lizina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirozina şi valina.

Auclair şi Dubreuil [1], analizînd aminoacizii după metoda Consden, Gordon şi Martin [4], prin cromatografie bidimensională, au obţinut la larvele de *Bombix mori* 13 — 14 aminoacizi. Rezultate similare asupra

Tabelă

Cantitatea de aminoacizi din hemolimfa larvelor de *Agrotis segetum* Schiff (mg la 100 ml hemolimfă)

Aminoacizi	Larve martor	Larve intoxicate cu Detox 25	Diferenţa
Alanină	13	8	5
Ac. aspartic	109	32	77
Ac. glutamic	400	288	112
Fenilalanină	82	118	+ 36
Glutamină	444	308	136
Histidină	243	214	29
Leucină	83	54	29
Lizină	143	200	+ 57
Treonină	26	31	+ 5
Tirozină	125	103	22
Valină	116	73	43
Total	1 784	1 429	355

conținutului în aminoacizi s-au obținut și la alte larve din familiile *Sphyngidae* și *Papillionidae* (*Lepidoptera*), de către Duchateau și Florkin [6], folosind metoda microbiologică.

Din analiza cantitativă a aminoacizilor din larvele de *Agrotis segetum* Schiff, hrănite cu varză netratată, a rezultat că se găsesc într-o cantitate mai mare (așa cum se constată în tabelă) glutamina, acidul glutamic, histidina, lizina, tirozina, valina, acidul aspartic, pe cînd alți aminoacizi, ca alanina, treonina și leucina se găsesc într-o cantitate mai mică.

La larvele hrănite cu varză tratată, în majoritatea cazurilor cantitatea de aminoacizi a scăzut. Astfel, au scăzut glutamina, acidul glutamic, acidul aspartic, valina, leucina, histidina, tirozina și alanina.

Sînt totuși unii aminoacizi, ca lizina, fenilalanina și treonina, esențiali pentru organismul animal, care au crescut la larvele tratate. Considerăm că ridicarea nivelului acestor aminoacizi ar favoriza o oarecare rezistență a larvelor la toxicul ingerat. Cu toate acestea, dezechilibrul produs în nivelul aminoacizilor a contribuit, alături de alți factori încă nedeterminați, la starea letală a larvelor.

CONCLUZII

1. Larvele hrănite cu varză tratată cu Detox 25 în concentrație de 0,75%, în doză corespunzătoare la 1 500 l/ha soluție, au manifestat din primele 4 — 6 ore simptome de paralizie, iar după 20 de ore 80% din ele nu se mai hrăneau.

2. Prin analiza cromatografică s-au găsit în hemolimfa larvelor 14 aminoacizi liberi: alanina, acidul aspartic, acidul glutamic, histidina, glutamina, glicocolul, leucina, lizina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirozina și valina. Nivelul majorității aminoacizilor menționați a scăzut la larvele hrănite cu varză tratată, față de acela al larvelor hrănite cu varză netratată; excepție au făcut fenilalanina, lizina și treonina, care au crescut.

3. Cantitatea totală de aminoacizi din hemolimfa larvelor hrănite cu varză tratată cu Detox 25 a scăzut.

4. Prin hrănirea larvelor cu varză tratată cu Detox 25, deși unii aminoacizi esențiali pentru organismul animal, ca fenilalanina, lizina și treonina, cresc, favorizînd poate o oarecare rezistență la toxic, totuși dezechilibrul produs în raportul dintre aminoacizi a contribuit, alături de alți factori, la starea letală a larvelor.

Prezentată la redacție la 14 martie 1968

Universitatea București,
Facultatea de biologie,
Catedra de biochimie

BIBLIOGRAFIE

1. Auclair J., Dubreuil R., *A simple ultramicromethod for the cantitative estimation of amino-acids by paper chromatography*, Canadian Journal of Zoology, **30**, *2*, 109—113 (1952).
2. Auclair J., Dubreuil R., *Étude sur les acides aminés libres de l'hémolymphe des insectes par la méthode de chromatographie sur papier filtre*, Canadian Journal of Zoology, **31**, *1* (1953).

3. Barrolier J., *Ein Ninhidrinreagens für quantitative Aminosäurebestimmungen auf Papierchromatogrammen*, Naturwissenschaften, **42**, 416 (1955).
4. Consden R., Gordon H., Martin J. P., *Qualitative analysis of proteins, a partition chromatographic method using paper*, Biochemical Journal, **38**, 224—262 (1944).
5. Drilhon A., *Étude de la répartition des acides aminés libres dans le sang des insectes par la chromatographie de partage*. Comptes rendus des séances et mémoires de la Societé de Biologie, **144**, 224—226 (1950).
6. Duchateau G., Florkin M., *A survey of amino acidemies with special reference to the concentration of free aminoacids in insect hemolymph*, Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie, **66**, *4*, 573—591 (1958).
7. Levenbook L., *Contribution à l'étude du sang des insectes*, Bulletin Soc. Chimie Biologique, **31**, *2*, 460 (1949).

THE CHROMATOGRAPHIC STUDY OF AMINO-ACIDS FROM THE GRUBS' HEMOLYMPH OF *AGROTIS SEGETUM* SCHIFF AND THE INFLUENCE OF DETOX 25 TREATMENT

SUMMARY

Agrotis segetum Schiff grubs at the beginning of the last growth period, fed on treated cabbage, were active to the moment of sacrificing. But the grubs fed on cabbage treated with Detox 25 emulsive in 0.75% concentration, manifested in the first 4—6 hours symptoms of paralysis and after 20 hours 80% did not feed any more.

The chromatographic analysis of amino-acids from the control group of grubs' hemolymph (fed on untreated cabbage) and from grubs fed on treated cabbage revealed the following amino-acids: alanine, aspartic acid, glutamic acid, histidine, glutamine, glycine, leucine, lysine, phenyl-alanine, proline, serine, threonine, tyrosine and valine. The level of amino-acids from the grubs fed on treated cabbage diminished as compared to that from the grubs fed on untreated cabbage from 1 784 to 1 429 mg/100 ml hemolymph.

ST. CERC. BIOCHIM. 11, 4, 413–419 (1968)

STUDII COMPARATIVE PRIVIND UNELE ASPECTE BIOCHIMICE DIN SCOARȚA UNOR SORTURI ȘI CLONE DE PLOP, CULTIVATE ÎN ȚARA NOASTRĂ

NOTA I

IOANA TĂNASE și VICTORIA MOCANU

Rezumat. — S-au pus în evidență în scoarța sănătoasă de plop o serie de componente metabolic active, ca acizi nucleici, aminoacizi liberi și legați, glucide libere, acizi grași nesaturați și clorofile. S-a folosit scoarță de la diferite clone și sorturi de plop, pentru a stabili în ce măsură ele se deosebesc din punct de vedere biochimic. Se discută semnificația diferențierilor constatate la nivelul componenților metabolici cercetați.

Cultura plopilor a luat o mare dezvoltare în ultima vreme, mai cu seamă în țările din Europa, dată fiind importanța economică a acestor specii forestiere [1], [2].

Selecționarea plopilor în vederea obținerii unor biotipuri cu receptivitate scăzută față de agenții patogeni presupune cunoașterea aprofundată a particularităților lor biologice specifice.

Cercetările efectuate la noi [3] și în alte țări [4], [5] au arătat că diferitele specii, sorturi și clone de plop se comportă diferit față de atacul diverșilor agenți patogeni. Acest fapt presupune diferențieri la nivelul întregii organizări biologice a plantelor respective, ca rezultat al unui anumit echilibru intracelular între diferite cicluri metabolice.

În lucrarea de față ne-am propus să stabilim în ce măsură clonele de plop cultivate frecvent în țara noastră se deosebesc între ele din punct de vedere biochimic, urmărind în acest scop o serie de componente metabolic active, cum ar fi acizii nucleari, amonoacizii liberi și legați, glucidele libere, acizii grași nesaturați și clorofilele.

MATERIAL ȘI METODĂ

Ca material de experiență s-a folosit scoarță sănătoasă de plop, recoltată la 17.IV.1967, de pe ramuri de 1,6 — 2 cm diametru, provenite de la exemplare de diferite sorturi și clone de plop dezvoltate normal, care constituiau o cultură comparativă în incinta Stațiunii experimentale INCEF Cornetu.

Exemplarele de plop de la care s-a recoltat scoarța aveau vîrsta de 5 ani și provin din material selecționat în cadrul Stațiunii Cornetu de către colectivul ing. dr. Alexandru Clonaru și ing. Suzana Ocskay.

Plantele de experienţă au fost grupate în 8 loturi, fiecare constituit din cîte 10 exemplare. Clonele şi sorturile de plop (*Populus*) de la care s-a folosit scoarţa sînt arătate în tabela 1.

Tabela 1

Sorturile şi clonele de plop, la care s-au urmărit în scoarţă unii constituenţi metabolici activi

Nr. crt.	Denumirea sorturilor şi clonelor de plop	Data recoltării scoarţei	
		ziua	luna
1	*P.* x *euramericana* (Dode) Guinier cv. 'Robusta' R. 20	17	aprilie
2	*P.* x *euramericana* (Dode) Guinier cv. 'Robusta' R. 16	17	„
3	*P. nigra* var. *thevestina* 'R. 103'	17	„
4	*P.* x *euramericana* (Dode) Guinier cv. 'I.214'	17	„
5	*P.* x *euramericana* (Dode) Guinier cv. 'Serotina' R. 3	17	„
6	*P.* x *euramericana* (Dode) Guinier cv. 'Argeş'	17	„
7	*P.* x *euramericana* (Dode) Guinier cv. 'Robusta' Oltenița	17	„
8	*P.* x *euramericana* (Dode) Guinier cv. 'Regenerata' Celei	17	„

De la fiecare lot experimental s-au recoltat în jur de 100 g scoarţă proaspătă, care s-a uscat într-o etuvă la 105°C, pînă la greutate constantă.

Scoarţa astfel uscată s-a sfărîmat pînă la obţinerea unei pulberi fine, după care s-a cernut printr-o sită ale cărei ochiuri nu depăşesc 60 microni.

Pentru separarea şi analiza cantitativă a acizilor nucleici s-au cîntărit 0,4 g pulbere de scoarţă, care s-a hidrolizat timp de 30 min cu o soluţie de acid tricloracetic 5%, pe baie de apă la fierbere.

Pentru analiza cantitativă a ADN-ului şi ARN-ului s-a dezvoltat reacţia de culoare cu *p*-nitrofenilhidrazină pentru dezoxiriboză şi reacţia cu orcinol pentru riboză, după metoda Webb şi Levy [6].

Pentru analiza glucidelor libere s-au folosit extractele alcoolice de 24 ore, obţinute din 0,4 g pulbere de scoarţă, care s-au cromatografiat prin cromatografia de partiţie pe hîrtie, în developare descendentă, unidimensională simplă, folosind un sistem de solvenţi format din butanol — acid acetic — apă (150 :30 :70).

Revelarea compuşilor glucidici pe cromatogramă s-a făcut cu o soluţie etanolică 4% de anilină şi o soluţie etanolică 4% de difenil-amină şi acid ortofosforic 85%, în proporţie de 5 :5 :1, folosind sistemul imersării, după care cromatograma se încălzeşte cu precauţie timp de 5 min la 80°C [7]. Pentru analiza cantitativă s-a folosit procedeul măsurării suprafeţei fiecărui compus separat, după care se raportează la o curbă de etalonare cromatografică obţinută în condiţii identice.

Pentru extracţia aminoacizilor liberi s-a folosit un amestec format din acetonă clorhidrică (100 ml acetonă + 1 ml HCl concentrat). Extracţia s-a efectuat într-un termostat la 37°C, timp de 24 de ore. Separarea şi analiza cantitativă a aminoacizilor liberi s-a făcut după tehnica descrisă într-o lucrare anterioară [8].

Pentru separarea aminoacizilor legaţi în structuri peptidice s-au folosit hidrolizate acide (HCl 5 N timp de 4 ore la 90°C) care s-au prelucrat şi cromatografiat în condiţii identice cu acelea pentru aminoacizii liberi.

Controlul analizei cantitative a unor aminoacizi, cum ar fi arginina, serina și histidina, s-a făcut prin metode chimice [9]- [11].

Separarea acizilor grași nesaturați s-a făcut cromatografic, după extracția lipidelor din 0,6 g scoarță timp de 24 de ore, cu un amestec format din cloroform — metanol în proporție de 2 :1 în volume [12], după care se developează radial, timp de 2 ore, în sistemul de solvenți descris de Borisova și Budnițkaia [13].

Separarea clorofilelor s-a făcut după extracție cu acetonă și developare pe hîrtii impregnate cu oleum paraffini, într-o soluție benzenică 5% [14].

REZULTATE

Din analiza aminoacizilor liberi și legați a acizilor nucleici, a glucidelor libere, a clorofilelor și a acizilor grași nesaturați s-a ajuns la următoarele rezultate :

— În scoarța sorturilor și clonelor de plop urmărite s-a pus în evidență prezența a cinci componente glucidice, și anume celobioză, glucozamină, ramnoză, glucoză și fructoză (tabela 2).

Tabela 2

Cuprinzînd valorile glucidelor libere extractibile în alcool din scoarța de plop (g % țesut uscat)

Compusul	Valorile glucidelor libere din scoarță de plop de diferite sorturi și clone *)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Celobioză	0,20	0,15	0,25	0,20	0,20	0,16	0,18	0,20
Glucozamină	0,10	0,10	0,10	0,13	0,12	0,10	0,10	0,14
Ramnoză	1,20	1,30	1,40	1,30	1,40	1,80	1,40	1,80
Glucoză	0,60	0,50	0,40	0,70	0,60	0,60	0,50	0,50
Fructoză	0,30	0,40	0,30	0,30	0,25	0,30	0,40	0,30

*) 1—8 = clonele și sorturile de plop cercetate (vezi tabela 1).

— Nu se constată modificări calitative și nici cantitative însemnate la nivelul acestor compuși, cu excepția ramnozei, care prezintă valori mai crescute la sorturile Argeș și Celei.

— La toate sorturile și clonele de plop urmărite, clorofilele, acizii grași nesaturați și acizii nucleici se mențin sub raport cantitativ și calitativ în aceleași limite.

— Fondul aminat liber din scoarța clonelor R. 103, R. 3 și a sortului Oltenița este mai sărac comparativ cu celelalte clone și sorturi, iar cel mai mare conținut în aminoacizi liberi se găsește în scoarța clonei I. 214 și a sortului Celei (tabela 3). Clona R. 3 și sortul Argeș prezintă valori scăzute în ce privește conținutul în aminoacizi legați (tabela 4).

DISCUȚII

Din faptul că în scoarța sorturilor și clonelor de plop studiate nu se constată modificări calitative și nici cantitative la nivelul acizilor nucleici, clorofilelor și acizilor grași nesaturați se poate deduce că toate sor-

Tabela 3

Valorile aminoacizilor liberi

Aminoacizi	Aminoacizi liberi							
	1*)	2	3	4	5	6	7	8
Cisteină	5,5±1	4,8±1,3	1,6±0,2	10±2	6±0,3	4,4±1	2±0,1	8±3
Glutamină	—	—	—	—	—	—	—	—
Histidină	24±7	33±4	24±3	54±5	20±4	13±0,6	18±1,6	51±6
Cistină	7,6±3,2	9±2	5±0,4	15±3	8±0,7	6±0,8	4±0,2	17±2
Treonină	20±1,4	24±5	14±0,7	36±4	17±1,6	14±2	11±0,6	41±3
Arginină	38±3	40±6	30±0,6	57±6	42±6	38±4	25±0,8	61±6
Lizină	53±6	44±5	21±4	62±7	49±5	20±5	19±0,6	71±6
Glicocol	8,6±1,2	10±3	5±0,2	20±4	11±2	9±1,7	4,4±0,5	18±3
Serină	22±3	18±2	11±0,3	34±5	26±4	28±4	6±0,7	30±3
Tirozină	13±2	8±1,5	8±2	16±2,4	17±1,8	11±0,6	9±0,4	18±1,6
Metionină	24±4	17±0,4	10±1,6	23±3,4	31±5	17±6	13±0,6	20±4
Valină	41±3	36±8	20±4	66±7	48±3	60±8	18±0,5	70±8
Fenilalanină	13±0,6	10±0,4	6±0,5	24±5	16±0,7	30±4	4±0,1	22±4
Izoleucină	6±1	5±0,2	3±0,2	13±0,7	7±1,6	14±0,8	5±0,8	12±0,8
Leucină	60±7	71±7	35±6	92±8	72±8	88±6	41±4	90±10
Alanină	54±5	60±6	24±4	77±6	64±6	69±5	18±0,4	69±5
Ac. glutaminic	49±8	52±4	31±5	60±7	57±5	60±9	29±6	72±8
Ac. aspartic	20±2	23±4	11±3	34±6	28±4	40±6,5	16±4	29±3

*) 1 – 8 = clonele și sorturile de plop cercetate (vezi tabela 1).

Tabela 4

Valorile aminoacizilor legați din scoarța de plop (mg/g produs uscat)

Aminoacizi	Aminoacizi legați							
	1*)	2	3	4	5	6	7	8
Cisteină	10±2	8±0,7	4±1	8,8±2	4±1,3	3±0,4	9±0,6	7±0,5
Glutamină	—	—	—	—	—	—	—	—
Histidină	30±4	40±5	24±5	36±4	13±2	8±0,5	27±3	39±6
Cistină	50±6	60±7	51±4	64±6	26±5	12±0,7	41±5	62±8
Treonină	40±4	50±6	40±3	65±2,5	24±3	10±0,6	36±3	52±10
Arginină	60±7	80±11	33±4	80±3	17±5	9±0,5	51±9	78±14
Lizină	190±17	230±30	200±14	270±18	94±10	70±8	160±20	250±40
Gliococol	69±11	92±20	80±8	90±7	33±6	30±5	120±30	81±30
Serină	230±40	300±40	250±30	280±40	120±14	111±13	350±60	340±50
Tirozină	71±8	55±7	69±7	56±6	32±7	28±7	49±9	49±6
Metionină	40±9	60±12	50±6	64±4	21±5	20±3	70±8	58±13
Valină	240±31	340±30	300±18	370±10	140±13	126±14	400±40	320±40
Fenilalanină	80±6	120±18	100±10	108±9	46±8	40±7	160±24	110±16
Izoleucină	22±6	36±8	30±5	43±4	14±2	11±0,8	48±6	42±7
Leucină	490±40	490±36	530±40	490±7	250±9	220±13	600±40	510±52
Alanină	550±50	460±40	600±50	590±30	300±40	280±30	560±30	500±60
Ac. glutamic	620±70	700±19	700±60	680±40	350±20	300±17	670±50	640±24
Ac. aspartic	81±7	120±9	90±8	130±4	60±8	58±9	140±36	100±16

*) 1–8 = clonele și sorturile de plop cercetate (vezi tabela 1)

turile şi clonele urmărite posedă anumite caractere biologice esenţiale similare, care nu permit diferenţierea lor.

Dacă se ia în considerare echilibrul proteic, evaluat prin fondul de aminoacizi liberi şi legaţi în structuri peptidice, se poate presupune existenţa unor caractere legate de specializarea fiziologică a fiecărui sort şi fiecărei clone de plop în parte.

Pe de altă parte, dacă ţinem seama de cercetările făcute de Brendel [5], care presupune că rezistenţa plantelor la atacul agenţilor criptogamici depinde de concentraţia substanţelor celulare dizolvate, putem deduce că numai unele dintre sorturile şi clonele de plop studiate de noi prezintă un potenţial de apărare mai crescut, şi anume clona I 214 şi sortul Celei, deoarece la acestea se constată o concentraţie crescută de aminoacizi liberi şi legaţi acvosolubili, în timp ce clona R. 3 prezintă cea mai scăzută concentraţie în aminoacizi solubili.

Desigur că modificările ce apar în concentraţia aminoacizilor liberi şi legaţi la unele din sorturile şi clonele studiate ne fac să ajungem la concluzia că există o serie de factori biochimici, bine determinaţi, care reglează mecanismele biologice ale plantei atît în procesele de apărare la atacul agenţilor patogeni cît şi în cele de dezvoltare a ei.

Pentru a putea trage concluzii definitive asupra selecţionării sorturilor şi clonelor de plop după criterii biochimice, se impune completarea acestor date şi cu alte componente biochimice cu rol plastic şi energetic în fiziologia plantei.

Cercetările viitoare vor trebui, într-un prim stadiu, să stabilească modificările biochimice ce au loc în scoarţa clonelor şi sorturilor de plop sub influenţa unor agenţi criptogamici periculoşi, ca apoi să se treacă la găsirea unor substanţe biostimulatoare care să refacă echilibrul biochimic dereglat sub acţiunea agenţilor patogeni.

CONCLUZII

1. În scoarţa clonelor şi sorturilor de plop studiate nu se constată deosebiri calitative şi nici cantitative la nivelul acizilor nucleici, clorofilelor şi acizilor graşi nesaturaţi.

2. Cel mai mare conţinut în acizi aminaţi liberi şi legaţi se găseşte în scoarţa clonei I. 214 şi a sortului Celei, de unde se poate deduce că rezistenţa acestora faţă de agenţii patogeni este crescută.

3. Clona R. 3 şi sortul Argeş prezintă cel mai sărac fond aminat liber şi legat, putîndu-se presupune o slabă capacitate de apărare a acestora.

4. Se impune completarea arsenalului biochimic cu date referitoare şi la alte componente cu rol plastic şi energetic în fiziologia plantei, pentru a se putea trage concluzii definitive asupra selecţionării sorturilor şi clonelor de plop în scopuri economice, după criterii biochimice.

Prezentată la redacţie la 1 martie 1968

Colectivul de chimio-terapie al
Academiei Republicii Socialiste România
Institutul de cercetări forestiere
Staţiunea cultura plopului „Cornetu"

BIBLIOGRAFIE

1. C. I. Popescu, V. Dobrescu, *Cultura plopilor euramericani*, Ed. agrosilvică, 1965.
2. C. I. Popescu, *Realizări noi în cultura plopilor*, I.D.T., 1965.
3. V. Mocanu, E. Poleac, E. Georgescu, St. Bărbat, L. Croitorescu, A. Popa, St. cerc. INCEF, **XXVI**, 211 (1965).
4. H. Butin, Der Forst- und Holzwirt, *12*, 266 (1964).
5. G. Brendel, Phytopath. Z., **53**, *1*, 1 (1965).
6. J. M. Webb, H. B. Levy, J. Biol. Chem., **213**, 107 (1955).
7. I. M. Hais, K. Macek, *Cromatografia pe hîrtie*, Ed. tehnică, 1960.
8. I. Tănase, *Tehnica cromatografică*, Ed. tehnică, 1967.
9. W. R. Frisell, G. G. Mackenzie, *Technique de laboratoire*, Ed. J. Loiseleur, Masson, 1963, vol. I, p. 1122.
10. K. Satake, J. M. Luck, Bull. Soc. Chem. Biol., **40**, 1743 (1958).
11. P. M. Newman, J. H. Turnbull, Biochem. J., **74**, 379 (1960).
12. M. Faure, *Extraction, séparation et dosage des lipides*, în : *Techniques de laboratoire*, Ed. J. Loiseleur, 1963, p. 1247.
13. J. G. Borisova, E. V. Budnițkaia, Biohimia, **28**, *3*, 497 (1963).
14. E. Lederer, *Chromatographie en chimie organique et biologique*, Ed. Masson, 1960, vol. II.

COMPARATIVE STUDIES ON SOME BIOCHEMICAL INDICES CONCERNING THE BARK OF DIFFERENT POPLAR CLONES AND VARIETIES IN ROMANIA

SUMMARY

In healthy bark of poplar, a series of active metabolic compounds were evidenced, such as nucleic acids, free and bound amino-acids, free glucides, unsaturated fatty acids and chlorophylls. Bark from different clones and varieties of poplars were used for establishing the extent to which they differed biochemically. The significance of the differences found at the level of the investigated metabolic compounds is discussed.

ST. CERC. BIOCHIM. 11, 4, 421–425 (1968)

SEPARAREA PRIN CROMATOGRAFIE ÎN STRAT SUBȚIRE DE SILICAGEL A COMPUȘILOR IMIDAZOLICI DIN MUȘCHII ȘI FICATUL DE ȘOBOLAN

DINU TĂNĂSESCU și TRAIAN BENȚIA

Rezumat. — S-a adaptat o tehnică de cromatografie în strat subțire de silicagel H a compușilor imidazolici din ficatul și mușchii gastrocnemieni de șobolani. Irigarea s-a efectuat cu ajutorul a două sisteme de irigare : butanol-acid acetic-apă (110 : 30 : 110) și propanol-butanol-amoniac conc. (2 : 2 : 1), ultimul avînd puterea de rezoluție cea mai avansată.

Extracția compușilor imidazolici a fost făcută cu ajutorul a trei medii diferite : acetonă clorhidrică, zaharoză-EDTA-tampon TRIS-HCl pH 7,2 și acid tricloracetic 10% primele două dînd rezultatele cele mai bune. Pentru îndepărtarea substanțelor care pot interfera cromatograma este necesară o trecere în prealabil a extractului pe coloană de Zerolit 225.

Au fost puse în evidență, prin pulverizare cu reactivul Pauly, carnozina, histidina și un al treilea compus neidentificat.

Prin extracția cu acid tricloracetic 10% s-a constatat că are loc o hidroliză avansată a carnozinei, care este mai accentuată în cazul aceleia de origine hepatică. În cazul unei extracții corecte histidina liberă nu se găsește decît în urme.

Rolul biologic al compușilor imidazolici este pînă astăzi încă incomplet cunoscut, cu toate intensele cercetări efectuate, iar unele rezultate sînt contradictorii. Astfel, deși carnozinei, principalul reprezentant al compușilor imidazolici, i s-au atribuit o serie de efecte metabolice importante, dintre care citățm : un efect de protejare a fosforilării oxidative [1], de activare a glicolizei [2], de tamponare [2], [3], sau un rol activ în sinteza creatinfosfatului și a ATP-ului [4], multe din aceste efecte au fost ulterior infirmate [5].

Aceleași considerații le putem face cu privire la cercetările efectuate asupra altor doi reprezentanți ai acestor clase de substanțe, și anume histidina și 3-metilhistidina [6].

Deoarece printre cauzele acestor rezultate contradictorii figurează și condițiile diferite de extracție și separare, care uneori au fost neadecvat alese, în nota de față prezentăm observațiile noastre asupra acestor aspecte.

MATERIAL ȘI METODE

S-a lucrat pe ficat și mușchi gastrocnemian de șobolan (rasa *Wistar*) Imediat după decapitarea animalului, cele două organe au fost spălate cu o soluție fiziologică rece și s-au înghețat în azot lichid. Au fost luate probe de praf de mușchi și de ficat, între 0,6 și 1,5 g, iar extracția compușilor imidazolici s-a făcut prin omogenizarea prafului de mușchi sau ficat cu extractant în raportul 1 :5, cu una din soluțiile următoare : acid triclor-acetic 10%, acetonă clorhidrică (1 ml acid clorhidric conc. la 100 ml acetonă) sau zaharoză 0,3 M — EDTA-$Na_2$3 mM în tampon TRIS-HCl pH 7,5 [7]. După o centrifugare de 15 min la 5 000 ture/min, supernatantul a fost trecută într-o coloană de zerolit 225, eluția compușilor imidazolici făcîndu-se cu o soluție de amoniac 5% [8].

În cazul extracției efectuate cu acetonă clorhidrică, în unele variante experimentale supernatantul a fost adus la sec și s-a analizat fără o trecere prealabilă pe coloana cromatografică.

Cromatografia în strat subțire de silicagel (*Kieselgel H nach Stahl für die Dünnschichtchromatographie, 10 — 40* μ, *Merck*) s-a efectuat pe plăci de sticlă de 9 × 18 cm. Plăcile au fost preparate prin pipetarea a 15 ml dintr-un amestec de silicagel/apă distilată 1 :3, bine agitat. Stratul a fost uniformizat prin înclinarea cu grijă a plăcilor în toate direcțiile. După ce s-au lăsat 1 — $1^1/_2$ore la temperatura camerei, plăcile au fost ținute timp de 3 ore la 110°C.

Probele au fost pipetate (10 — 30 μl) la 5 cm de capătul plăcilor. După o perfectă uscare a probelor aplicate, plăcile au fost așezate pe marginea unei cuve de sticlă de 5 cm înălțime, 4 cm lățime și 19 cm lungime, astfel că migrarea a avut loc sub un unghi de 35°. Legătura între placă și lichidul de irigare s-a făcut cu două fîșii de hîrtie Whatmann nr. 2 Timpul de irigare a fost de 16 — 18 ore și separarea s-a efectuat la temperatura camerei.

Au fost folosite două sisteme de irigare : *n*-butanol-acid acetic glacial-apă (110 :30 :110) și *n*-butanol-propanol-NH_3 conc. (2 :2 :1), ultimul sistem fiind folosit în mod curent, deoarece a permis cea mai bună separare.

Spoturile compușilor imidazolici au fost puse în evidență prin pulverizarea cu reactivul specific Pauly (azotit de sodiu 5%, acid sulfanilic 1% și carbonat de sodiu anhidru 10%, în raportul 1 :1 :2 [9]) sau cu o soluție de ninhidrină 0,3% în alcool.

Ca soluții martor s-au aplicat cîte 10 μl din soluții M/100 de histidină, 3-metilhistidină, 1-metilhistidină sau carnozină (Calbiochem).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Cum se poate vedea din figura 1, în condițiile noastre de lucru se realizează o separare netă a carnozinei și histidinei folosite ca martori, principalii compuși imidazolici musculari, fapt care ne-a permis trecerea la efectuarea experiențelor propriuzise.

Primul mediu de extracție folosit a fost acetona clorhidrică, mediu des utilizat în cercetarea aminoacizilor liberi din sînge și alte materiale biologice. Încercări prealabile făcute cu acest mediu ne-au arătat că, în condițiile noastre de lucru, hemoglobinele din urmele de sînge rămase în organele neperfuzate dau spoturi care pot incomoda interpretarea cromatogramelor.

Pentru a înlătura acest neajuns, extractele centrifugate au fost trecute printr-o coloană de Zerolit 225, schimbător de ioni care reține selectiv aminoacizii, inclusiv dipeptidul carnozina, eliminîndu-se astfel toate substanțele interferente. După cum se poate vedea în figura 2, prin trecerea pe coloană nu are loc hidroliza carnozinei, nefiind observate decît urme de histidină. În aceste condiții, după trecerea prin coloana de Zerolit 225, utilizînd ca mediu de extracție soluția formată din zaharoză EDTA și tampon TRIS-pH 7,2, atît în ficat cît și în mușchi constatăm prezența predominantă a spotului de carnozină, cît și a unei cantități reduse de histidină liberă. Accentuăm asupra acestui fapt, deoarece recent, datorită unei greșeli de interpretare, s-a făcut afirmația eronată că histidina liberă s-ar găsi în mușchi într-o concentrație deosebit de ridicată [11]. În afară de acești doi compuși a mai fost identificat, atît în ficat cît și în mușchi, un al treilea spot Pauly pozitiv. Un component asemănător, nu putem preciza dacă identic cu acela semnalat de noi, a mai fost citat în literatură [9], și a rămas de asemenea încă neidentificat. Rezultate identice au fost obținute prin utilizarea acetonei clorhidrice ca mediu de extracție. De altfel, cu aceste două medii de extracție au fost obținute rezultatele cele mai concludente, deoarece într-un mediu acid, ca de exemplu cel de acid tricloracetic 10%, are loc o hidroliză avansată a carnozinei. În acest ultim caz, deși condițiile experimentale au fost identice, hidroliza carnozinei din ficat a fost mult accentuată, în unele cazuri chiar totală, neputînd fi observat decît spotul histidinei (fig. 3).

Deoarece condițiile de lucru sînt foarte apropiate de acelea în care am studiat aminoacizii liberi din mușchi [8], pentru a verifica gradul lor de separare în condițiile cromatografiei în strat subțire de silicagel, am pulverizat plăcile și cu o soluție de ninhidrină în alcool.

Prin cromatografia în strat subțire în sistemul de irigare butanol-propanol-NH_3 nu se realizează însă o separare satisfăcătoare a compușilor ninhidrino-pozitivi din extractul total, și nici a martorilor de histidină și 1 — respectiv 3-metilhistidină (fig. 4). Este evident că prin pulverizarea cu ninhidrină nu se pot cerceta compușii imidazolici dintr-o soluție în care sînt prezenți și alți compuși ninhidrino-pozitivi, mai ales deoarece culoarea pe care carnozina o dă cu ninhidrina este de aproximativ cinci ori mai slabă decît cea dată de marea majoritate a aminoacizilor. În aceste condiții se impune deci pulverizarea cu reactivul Pauly, specific pentru compușii imidazolici.

Asupra condițiilor de extracție și — derivînd de aici — asupra localizării intracelulare a compușilor imidazolici au existat o serie de opinii contradictorii [9], [10]. Cu toate afirmațiile unor autori, carnozina se găsește în special în fracțiunea solubilă și a fost identificată doar într-o proporție limitată în miofilamente, mitocondrii, microzomi sau debriurile celulare.

Cele mai intense studii au fost efectuate asupra carnozinei din mușchi, unde ea se găsește în concentrația cea mai ridicată, fiind considerată un compus specific al acestui organ. Carnozina a mai fost identificată, și rezultatele noastre confirmă acest lucru, și în ficat, dar cercetările întreprinse sînt încă sporadice.

CONCLUZII

Acetona clorhidrică și amestecul de zaharoză-EDTA în tampon TRIS-HCe pH 7,2 sînt medii de extracție a compușilor imidazolici musculari și hepatici deosebit de adecvate.

Pentru o separare optimă este necesară însă o trecere în prealabil pe o coloană de Zerolit 225 a extractelor. Sistemul de irigare care a dat cele mai bune separări a fost amestecul format din butanol-propanol-NH_3. Cu ajutorul reactivului Pauly au fost puse în evidență atît în mușchi, cît și în ficat, trei spoturi : al carnozinei, al histidinei libere și al unui compus neidentificat.

În mediu acid (acid tricloracetic 10%) are loc o hidroliză parțială a carnozinei, într-un grad care diferă în funcție de originea acesteia, carnozina hepatică fiind hidrolizată într-un grad mult mai înaintat.

Se infirmă rezultatele obținute de alți cercetători care au afirmat că histidina liberă se găsește într-o concentrație ridicată în mușchi.

Prezentată la redacție la 27 martie 1968

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. E. A. Serstenev, *O vlianii carnosina na protessy fosforilirovania v myşecinoi tkani*, Dokladî Akad. Nauk SSSR, **119**, 753 (1958).
2. S. E. Severin, J. M. Bociarnicova, P. C. Vulifson, J. A. Gricorovici, G. A. Solovieva, *O biologhiceskoi roli carnosina*, Biohimia, **28**, 510 (1963).
3. W. J. Jencks, M. Hyatt, *Effect of carnosine on glycolysis*, Biochim. Biophys. Acta, **31**, 262 (1959).
4. S. E. Severin, *Problema biologiceskoi aktivnosti prirodnîh soedinenii imidazola*, Usp. Sovrem. Biol., **59**, 165 (1965).
5. C. J. Parker Jr., W. D. Langley, *The effect of carnosine and related compounds on the respiration of frog skeletal muscle homogenates*, Biochem. Biophys. Acta, **37**, 537 (1960).
6. A. Meister, *Biochemistry of the aminoacids*, Academic Press, New York, 1965, vol. I—II.
7. R. Czok, Th. Bücher, *Enzymes from muscle myogen*, Adv. Prot. Chem., **15**, 315 (1960).
8. D. Tănăsescu, *Participarea metabolismului muscular a aminoacizilor liberi intracelulari*, St. cerc. biochim., **9**, 367 (1966).
9. W. J. Reddy, D. M. Hegsted, *The measurement and distribution of carnosine in the rat*, J. Biol. Chem., **237**, 705 (1962).
10. R. E. Winnick, S. Miskeha, T. Winnick, *Intracellular distribution of carnosine and anserine in skeletal muscle*, J. Biol. Chem., **238**, 3645 (1963).
11. H. Nakasawa, R. H. Lindsay, P. R. Cohen, *Composition and labelling patterns of "free" and protein aminoacids in Rana Catesbeiana tadpoles and frog*, Arch. Biochem. Biophys., **106**, 299 (1964).

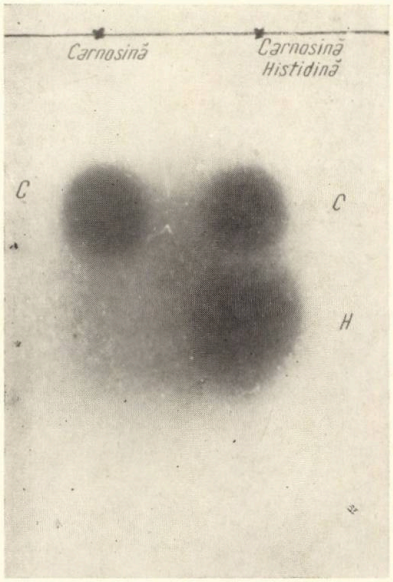


Fig. 1. — Cromatografia martorilor de carnozină (C), și histidină (H). Irigarea s-a făcut în sistemul propanol-butanol -amoniac conc. (2 : 2 : 1). Pulverizare cu reactivul Pauly.

Fig. 2. — Cromatografia compușilor imidazolici din mușchi și ficat extrași cu o soluție de zaharoză-EDTA-tampon TRIS pH 7,2 și trecut apoi pe o coloană de Zerolit 225. Martori de carnozină (C) și histidină (H). Irigare în sistemul propanol-butanol-NH_3. Pulverizare cu reactivul Pauly.

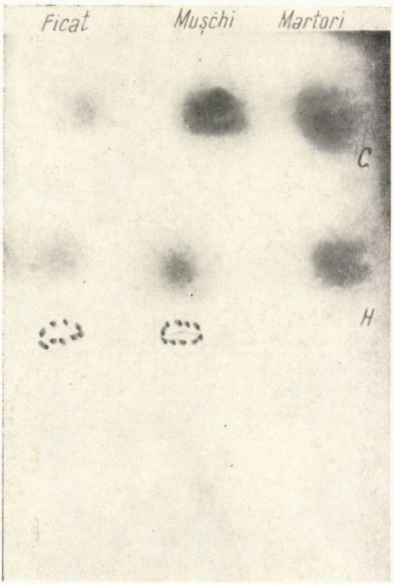


Fig. 3. — Cromatografia compușilor imidazolici din mușchi și ficat extrași cu o soluție de acid tricloracetic 10% și trecut apoi pe coloană de Zerolit 225. Martori de carnozină (C) și histidină (H). Irigare în sistemul propanol-butanol-NH_3. Pulverizare cu reactivul Pauly.

Fig. 4. — Cromatografia martorilor de histidină (H), 1-metilhistidină (1-mH), și 3-metilhistidină (3-mH). Irigare în sistemul propanol-butanol-NH_3. Pulverizare cu ninhidrină 0,3% în alcool.

SEPARATION OF IMIDAZOLE COMPOUNDS OF RAT LIVER AND MUSCLE BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY ON SILICAGEL

SUMMARY

Thin layer chromatography method was applied in silicagel H of the rat liver and gastrocnemius muscles imidazole compounds. The irrigation was performed by means of two irrigation systems : butanol-glacial acetic acid — water (110 : 30 : 110) and propanol — butanol — conc. ammonia (2 : 2 : 1), the last solvent having the most advanced resolution.

The extraction of the imidazolic compounds was made in three different media : chlorhydric acetone, sucrose-EDTA-Tris-HCl buffer pH 7.2, and trichloroacetic acid 10%, the results of the first two being the best. In view of removing the substances which may interfere in the chromatograms, a previous chromatography of the extracts on a Zerolit 225 column was necessary.

By pulverization with Pauly's reagent carnosine, histidine and a third, unidentified, compound, were made evident.

By the extraction with 10% trichloroacetic acid we etablished an advanced carnosine hydrolysis, more marked in the case of that of hepatic origin.

In the case of a correct extraction, traces of free histidine can be found.

Progress in Biochemical Pharmacology (*Progrese în farmacologia biochimică*), vol. 4 : *Recent Advances in Atherosclerosis* (*Progrese recente în ateroscleroză*), redactori : C. J. MIRAS (Atena), N. A. HOWARD (Cambridge), R. PAOLETTI (Milan), editura S. KARGER, Basel (Elveţia) New York, 1968, 636 p., 236 figuri şi 151 tabele.

Volumul cuprinde lucrările Simpozionului Internaţional de Ateroscleroză, organizat de Societatea Europeană de Farmacologie în mai—iunie 1966, la Atena. S-au prezentat 80 lucrări, în 11 şedinţe, şi anume :

Epidemiologie (6 lucrări). Groen (Ierusalim) prezintă factorii care măresc riscul de îmbolnăvire. Aravanis (Atena) studiază două grupe din populaţia insulelor Creta şi Corfu, unde accidentele vasculare sînt rare, iar Groen şi colab. scot în relief aspecte epidemiologice la grupuri etnice diferite. Brunner (Jaffa) înregistrează decese de 2,4—4 ori mai multe la lucrătorii sedentari, faţă de cei nesedentari. McGill (New Orleans) publică primele rezultate ale unui studiu întreprins de 19 anatomopatologi din diferite oraşe ale lumii. Stamler şi colab. aduc date epidemiologic-statistice pe un grup de salariaţi din Chicago.

Organismul intact (5 lucrări). S-au studiat : metabolismul colesterolului (Ahrens, New York), efectul alimentaţiei asupra sterolilor din plasmă, bilă, fecale (Kinsell şi colab., Oakland). Mai mulţi autori insistă asupra rolului resorbţiei intestinale a colesterolului alimentar, studiată cu atomi marcaţi.

Lipoproteine (12 lucrări). Alupovic (Oklahoma) face o nouă clasificare a lipoproteinelor, pe baza componentei proteice din fracţiune „apolipoproteina". Două cazuri cu autoanticorpi, anti-beta şi hiperlipidemie (Beaumont, Paris), ca şi lucrările experimentale, au antrenat ample discuţii.

Lipidele plasmatice (8 lucrări). Carlson (Stokholm) aduce noi puncte de vedere în transportul lipidelor. Hiperlipidemia a fost corelată cu : acizii biliari (Frosch şi Wagner, Heidelberg), mucopolizaharidele gastrice (Gerö şi colab., Budapesta), obezitatea (Rifkind şi colab., Glasgow), secreţia de insulină (Nikillä, Helsinki) etc.

Artera (8 lucrări). S-au studiat de către diferiţi autori aspecte din metabolismul peretelui arterial : esterificarea colesterolului, sinteza fosfolipidelor, reţinerea şi filtrarea lipidelor etc. O remarcabilă lucrare de chimie analitică aplicată la materialul peretelui arterial se datoreşte lui Böttcher (Leyda).

Culturi de ţesuturi (9 lucrări). Cu ajutorul ţesuturilor din pereţii arteriali s-au studiat aspecte metabolice ca : activitatea enzimatică, (Pollak, Dower-U.S.A.), colesterolul, mucopolizaharidele, lipoproteinele (Hollander şi colab., Boston) şi altele.

Hormonii (7 lucrări). Relaţiile hormonilor gonadici cu lipemia şi bolile cu ischemie cardiacă sînt prezentate de Furman şi colab. (Oklahoma). Se semnalează scăderea mortalităţii la femei supravieţuitoare trombozei cerebrale tratate cu estrogeni, în timp ce la bărbaţi nu sînt ameliorări semnificative (Robinson, Worcester). Sólyon şi Pugliesi, Milano) relevă relaţia AGL-noradrenalină/acid nicotinic.

Primatele (6 lucrări). După Wissler (Chicago), experimentările pe acest ordin animal contribuie mai bine la cunoaşterea aterosclerozei. Afirmaţia este susţinută şi de alţi cercetători. Cu microscopul electronic, Daria Haust (Londra) găseşte în stratul gras din aorta umană unele fracţiuni proteice prezente numai la aterosclerоşi.

Neprimate (6 lucrări). Se descriu progrese în experimentul pe neprimate (Greshad şi Howard, Cambridge). La iepure, grăsimea bogată în acid palmitic e cea mai aterogenă (Kritchevsky şi Treper, Philadelphia). Se mai raportează asupra eficienţei unor preparate chimice.

Plachetele (6 lucrări). Se aduc cunoştinţe noi privind factorii plachetari şi de coagulare (Mustand şi colab., Hamilton), rolul lor în tromboză (Constantinides, Vancouver). Rolul fumatului, al catecolaminelor, interdependenţa plachete-coagulare-fibrinoliză sînt prezentate cu deosebită competenţă de mai mulţi autori.

Clinice (7 lucrări). Schettler (Heidelberg) prezintă orientări noi în tratamentul At. şi obligativitatea reducerii factorilor de risc ai îmbolnăvirii. Ultimele 6 lucrări verifică eficienţa unor medicamente antiaterosclerozice. Deosebită este constatarea lui Lijo-Pavia (Buenos Aires) de a fi folosit cu rezultate bune enzime de natură prostatică în orbirea prin ateroscleroza coroidei şi retinei.

Deşi foarte scurte, discuţiile care încheie fiecare şedinţă au uneori valoarea unei comunicări.

Sorin M. Idu
Clinica medicală I.M.F.-Colţea

Mitochondrial Structure and Compartmentation. (*Structura şi compartimentarea mitocondriilor*), redactori: E. Quagliariello, S. Papa, E. C. Slater, J. M. Tager, Editura Adriatica, Bari, 1967, 473 p.

Acest volum cuprinde rapoartele prezentate la o discuţie în jurul mesei rotunde privind structura şi compartimentarea mitocondriilor, care a avut loc în Italia, la Polignano a Mare, între 23 şi 25 mai 1966. Reuniunea a fost organizată de catedrele de biochimie de la Universităţile din Bari şi Amsterdam, sub conducerea prof. E. C. Slater. Discuţiile s-au centrat în jurul următoarelor cinci probleme:

1. Structura şi biochimia membranei externe a mitocondriilor (preşedinte D. F. Parsons).
2. Structura şi biochimia membranei interne a mitocondriilor (preşedinte D. E. Green).
3. Permeabilitatea membranelor mitocondriale faţă de molecule neutre, de anioni şi de cationi (preşedinte A. L. Lehninger).
4. Permeabilitatea membranelor mitocondriale faţă de nucleotide (preşedinte G. F. Azzone).
5. Compartimentarea reacţiilor mitocondriale (preşedinte L. Ernster).

Pentru primele două subiecte s-au prezentat tehnici perfecţionate de izolare a membranelor externă şi internă ale mitocondriilor, precum şi caracteristicile morfologice şi biochimice ale acestor formaţiuni (Parsons, Sottocasa, Green). Discuţiile purtate pe marginea rapoartelor prezentate au scos în evidenţă recunoaşterea unanimă a membranei interne ca sediu al lanţului respirator şi al fosforilării oxidative. În schimb, în ceea ce priveşte localizarea altor enzime, ca unele enzime din ciclul acizilor tricarboxilici sau implicate în oxidarea şi sinteza acizilor graşi, între poziţiile diverşilor autori există deosebiri considerabile. Identificarea citocromului b_5 şi a citocrom-b_5-reductazei în membrana externă ridică problema continuităţii dintre reticulul endoplasmatic şi membrana externă a mitocondriei, a originii comune a acestor două formaţiuni.

În cadrul celei de-a treia probleme s-au prezentat lucrări privind permeabilitatea membranelor mitocondriale faţă de molecule neutre (Pfaff), faţă de anioni (Van den Bergh, Tager,

Klingenberg, Bremer) şi faţă de cationi (Lehninger, Azzone, Rossi, Azzi). În timp ce membrana externă nu opune nici o piedică străbaterii moleculelor mici, cea internă apare impermeabilă faţă de anionii diverşilor acizi carboxilici. Se admite, în consecinţă, că în această membrană funcţionează unele sisteme catalitice apte să medieze transferul anionilor din spaţiul exterior în membrana internă sau pe suprafaţa opusă a membranei.

În cadrul celei de-a patra probleme au prezentat rapoarte Klingenberg, Heldt, Siliprandi, Pfaff, Quagliariello, Tager şi alţii. Mecanismul cît şi locul de acţiune al atractilozidului au fost în atenţia tuturor autorilor. S-au adus dovezi că atractilozidul împiedică trecerea ADP-ului şi a ATP-ului prin membrana internă, inhibînd în acest fel procesele enzimatice din membrana internă, dependente de aceşti nucleotizi (fosforilarea oxidativă, sinteza de acid ribonucleic, activarea acizilor graşi etc.).

Ultimul subiect înscris pe ordinea de zi a conferinţei, compartimentarea reacţiilor mitocondriale, a fost dezbătut pe marginea a 10 rapoarte prezentate de Pfaff, Lee, Papa, Garland, Quagliariello, Saccone, Bremer, Van den Bergh, Rossi, Ernster. Un viu interes a suscitat reacţia de transhidrogenare endergonică dintre NAD şi NADH, studiată de Ernster şi Lee, al cărei rol metabolic încă nu este înţeles.

Prin lucrările prezentate şi prin discuţiile ample care le-au însoţit, publicate şi ele integral, acest volum este preţios tuturor celor interesaţi în acest domeniu.

Elena Cristea
Catedra de biochimie,
Institutul de medicină şi farmacie
Bucureşti

Symposium on Modern Methods in the Investigation of Protein Structure (Simpozion asupra metodelor moderne în cercetarea structurii proteinelor), editat de F. B. Straub şi P. Friedrich, Academiai Kiadó, Budapesta, 1967, 93 p., Budapesta, 6—8 octombrie 1965.

Volumul cuprinde şase dintre lucrările prezentate la acest simpozion. În ele sînt descrise o serie de metode chimice şi fizico-chimice moderne de cercetare a structurii proteinelor, precum şi rezultatele obţinute.

Primul articol, intitulat „Analiza secvenţei peptidelor pe cale enzimatică", de H. Hanson şi S. Fittkau (10 p., 17 ind.bibl., 3 figuri, 3 tabele), descrie hidroliza parţială a proteinelor prin utilizarea enzimelor proteolitice. Pe lîngă endopeptidaze, ca tripsina, chimotripsina, pepsina, papaina şi subtilizina, sînt întrebuinţate şi o serie de exopeptidaze care scindează specific lanţul proteic, în funcţie de existenţa unor grupări aminice sau carboxilice libere. Se comentează condiţiile experimentale şi rezultatele obţinute prin utilizarea carboxipeptidazelor A şi B, precum şi a leucinaminopeptidazei, ultimei enzime fiindu-i consacrată marea majoritate a materialului din acest articol.

Al doilea articol, intitulat „Folosirea taninului pentru examinarea polipeptidelor, produse de degradare ale proteinelor", de W. Mejbaum-Katzenellenbogen (10 p., 18 ind. bibl., 9 figuri, o schemă), prezintă primele încercări de utilizare a taninului de China la studiul constituţiei polipeptidelor formate în timpul proteolizei enzimatice a caseinei, aducînd astfel date asupra structurii acestei proteine.

Articolul al treilea, intitulat „Analiza structurii cu raze X, difracţia electronică şi microscopia electronică în investigarea moleculelor biologice", de B. K. Vainshtein (26 p., 46 ind.

bibl., 24 figuri, 3 tabele), analizează comparativ rezultatele obținute cu un număr ridicat de proteine, unele dintre ele avînd și activitate enzimatică, cărora li s-a determinat simetria și spațiul dintre grupările funcționale. Aceasta a permis reprezentarea configurației spațiale a unor molecule, printre care citām mioglobina, hemoglobina, lizozimul etc.

Articolul al patrulea, intitulat „Rotația optică de dispersie și conformația lanțurilor polipeptidice", de P. Elödi (8 p., 15 ind. bibl., 2 figuri, 5 tabele), după ce menționează că inițial folosirea rotației optice de dispersie (ODR) a pornit de la observația că rotațiile specifice ale proteinelor native sînt mai puțin negative decît acelea ale proteinelor denaturate, arată cum din diferența dintre rotația optică a proteinelor native și denaturate s-a calculat conținutul helix al proteinelor, schimbările diferitelor constante de rotație corespunzînd la anumite schimbări în conformația lanțurilor polipeptidice; astfel constantele de rotație ale unor enzime în stare nativă diferă de acelea ale enzimelor în condiții de denaturare la detergenți.

Articolul al cincilea, intitulat „Modificarea chimică a lanțurilor de aminoacizi și schimbările conformaționale ale enzimelor", de G. Szabolcsi (8 p., 28 ind. bibl., 7 figuri), arată că tratarea unor enzime (gliceraldehiddehidrogenaza, lacticodehidrogenaza, aldolaza etc.) cu diferiți agenți chimici (paracloromercuribenzoat, acid monoiodacetic etc.) produce o serie de modificări ale lanțurilor de aminoacizi din centrul enzimatic activ, ceea ce induce atît schimbări structurale ale macromoleculelor cît și modificări ale activităților enzimatice.

Ultimul articol, al șaselea, intitulat „Cercetarea structurii protein-enzimelor corelate cu funcția catalitică a centrului activ", de A. E. Braunstein (22 p., 35 ind. bibl., 15 figuri, 1 tabelă), arată cum prin combinarea metodelor fizice, chimice și biologice s-au obținut informații care au permis pătrunderea în mecanismul intim al acțiunii enzimatice, respectiv în formarea complexului enzimă-substrat, ca și stabilirea structurii protein-enzimei în stare cristalină și, în anumite cazuri, configurația tridimensională a complexului enzimă-substrat.

Articolele publicate în volumul de față, prin valoarea și actualitatea lor, ca și prin modul în care au fost redactate, sînt de un real folos tuturor celor care studiază sau doresc să-și completeze cunoștințele din vastul și complexul domeniu al proteinelor.

Natalia Moldoveanu
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

18 — COLLOQUIUM DER GESELLSCHAFT FÜR PHYSIOLOGISCHE CHEMIE, 5—8 April 1967, Mosbach/Baden, *Wirkungsmechanismen der Hormone* (*Mecanisme de acțiune ale hormonilor*), sub redacția lui P. Karlson; Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 1967.

Acest volum reunește opt referate prezentate la cel de al 18-lea Colocviu al Societății de chimie-fiziologică, din 5—8 aprilie 1967, de la Mosbach/Baden, cu privire la mecanismul de acțiune al hormonilor. Fiecare referat este însoțit și de discuțiile purtate pe marginea lui. Referatele cuprinse în acest volum sînt următoarele:

„Rolul 3′, 5′-adenozinmonofosfatului ciclic în acțiunea hormonilor" de E. W. Sutherland, R. W. Butcher, G. A. Robison și J. G. Hardman. Autorii arată că deși la acțiunea diferiților stimuli asupra glandelor endocrine se eliberează hormoni (mesageri de ordinul I), în celule acțiunea hormonilor se exercită prin intermediul 3′, 5′—AMP ciclic (mesager de ordinul II). Lucrarea cuprinde 81 de indicații bibliografice.

„Acțiunea hormonilor asupra organelor izolate perfuzate" de H. Schimassek. Se prezintă rezultate recente (47 de indicații bibliografice) privind interdependența dintre inducerea enzimelor și fenomenele metabolice.

„Receptorii hormonali" de P. W. Jungblut, I. Hätzel, E. R. de Sombre și E. V. Jensen (cu 19 indicații bibliografice). Autorii arată că acceptorii mesajului hormonal sînt receptorii hormonali, despre care pînă nu de mult se vorbea numai teoretic. Ei au fost obținuți însă ca substanțe chimice, de sine stătătoare. După cum se bănuia, sînt de natură proteică.

„Ribozomii și hormoni tiroidieni" de J. R. Tata (cu 29 de indicații bibliografice) și „Acțiunea hormonilor asupra nucleului celular" de C. E. Sekeris (cu 87 de indicații bibliografice). Se arată că locul de formare și de acțiune al hormonilor este nucleul celular.

„Controlul hormonal al sintezei proteice la nivelul „translational" de G. M.Tomkins și E. B. Thompson. Autorii descriu sistemul experimental de lucru, deosebit de convenabil pentru cercetarea reglajului hormonal al sintezei proteice în celulele organismelor superioare. Sînt prezentate de asemenea unele ipoteze privitoare la mecanismele prin care hormonii controlează sinteza proteică.

„Cortizolul ca inductor enzimatic, în special în ceea ce privește gluconeogeneza" de W. Seubert (cu 120 indicații bibliografice). Pornind de la reacțiile de bază care au loc în gluconeogeneză, se urmărește acțiunea inductoare a cortizolului asupra enzimelor implicate în acest proces.

„Eritropoetina. Natura și mecanismul ei de acțiune" de P. P. Dukes (cu 39 de indicații bibliografice). Această lucrare este un exemplu de cercetare complexă și detaliată a acestui hormon care reglează formarea eritrocitelor în țesuturile hematopoetice. Autorul dă indicații privitoare la natura chimică, purificarea, dozarea, specificitatea și inhibitorii eritropoetinei.

„Inhibarea hormonală — cercetări cu antagoniști de testosteron" de F. Neuman, R. von Berswordt-Wallrabe, W. Elger, H. Steinbeck (cu 45 de indicații bibliografice) — ultima lucrare din acest volum — indică folosirea antihormonilor ca mijloc de cercetare a proceselor de dezvoltare și diferențiere celulară. Cu ajutorul acestei metode se pot aduce contribuții interesante la elucidarea diverselor probleme ale biologiei moleculare.

Ca o apreciere generală se poate spune că toate lucrările prezentate sînt la un înalt nivel științific; datele experimentale cuprinse în tabele, grafice, scheme și fotografii reprezintă un material ilustrativ valoros și bogat (84 de ilustrații). Volumul este deosebit de util biochimiștilor, endocrinologilor și medicilor.

Lucia-Doina Popov
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

D.A.T. DICK, *Cell water* (*Apa celulară*), London,Butterworths, 1966, 154 p., 21 figuri și 7 tabele.

Problema apei în celula vie s-a dovedit un cîmp de investigație de o importanță deosebită, prin valoarea informațiilor privitoare la diferitele aspecte ale metabolismului celular. Lucrarea își propune o rezumare a datelor științifice din ultimii 10 ani.

După ce în capitolul I se relevă importanța studiului apei în celulă și se face un mic istoric al dezvoltării acestor studii, în capitolul II se descriu structura și proprietățile apei ca și rolul acesteia în celule. Capitolul III are ca obiect relațiile dintre apă și substanțele dizolvate în ea. Se dau amănunțit bazele termodinamice ale legilor osmotice. Soluțiile proteinelor constituie subiectul unui subcapitol special. Sînt evidențiate caracteristicile termodinamice specifice

acestor soluții, caracteristicile deosebite față de cele ale soluțiilor ideale. De asemenea, sînt prezentate cîteva fenomene proprii soluțiilor proteice ca : hidratarea proteinelor, legarea ionilor, echilibrul Donnan. În capitolul IV se descriu mecanismele de transfer al apei în celula animală și, îndeosebi, procesul osmotic la acest nivel. În capitolul V se face o analiză a repartiției apei în nucleu, mitocondrii și alte organite celulare. Capitolul VI, consacrat permeabilității celulelor animale față de apă, prezintă relația dintre difuzie și permeabilitatea celulară. Sînt date cîteva metode pentru măsurarea permeabilității, se prezintă comparativ coeficienții de permeabilitate obținuți prin calcule osmotice sau prin determinări cu apă marcată, autorul urmărind să explice în cîteva moduri diferențele constatate între aceste valori. Tot aici sînt tabelate valorile coeficientului de permeabilitate al diferitelor tipuri de celule animale. Se discută raporturile dintre fenomenul de difuzie și cel de curgere în flux prin membranele semipermeabile. Într-un subcapitol se studiază energia de activare a procesului de pătrundere a apei prin membrana celulară atît din punct de vedere termodinamic, cît și fiziologic. În încheierea capitolului VI autorul studiază corelația dintre datele funcționale morfologice și chimice ale membranei celulare. Problema fluxului apei în celula vegetală este numai tangențial abordată în capitolul VII. Se face o prezentare teoretică a relațiilor osmotice în celula vegetală la echilibru. Sînt prezentate de asemenea cîteva experiențe de calcul al coeficientului de permeabilitate al celulelor vegetale. În ultimul capitol, al VIII-lea, se studiază corelația dintre fluxul apei și al substanțelor dizolvate. În prima parte a acestui capitol se face interpretarea termodinamică a procesului de flux simultan al apei și substanțelor dizolvate prin membrane poroase. Este descrisă metoda de calcul a dimensiunilor porilor, folosind așa-numiții „coeficienți de reflexie". În ultima parte a capitolului se discută fenomenul de transfer al apei și substanțelor dizolvate, prin membrane biologice, fiind citate cîteva din ipotezele care încearcă să explice acest fenomen.

Listele bibliografice ce însoțesc fiecare capitol, figurile, tabelele și indexul de la sfîrșitul volumului sînt de un real folos cititorului.

Spațiul larg acordat interpretării termodinamice a fenomenului de permeabilitate și substanțelor difuzibile la nivelul membranei celulare conferă lucrării un plus de rigurozitate de mare importanță pentru interpretarea științifică a datelor.

Prin actualitatea ei, prin importanța subiectului abordat, această lucrare este de un real folos celor interesați de problemele tratate.

Irina Marineanu
Institutul de Biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

OTTO LOEWI. *Ein Lebensbild in Dokumenten* (O imagine a vieții sale în documente), Fred Lembeck și Wolfgang Giere, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1968, 241 p.

Prin această lucrare ni se face cunoscută viața și opera savantului Otto Loewi, precum și ambianța științifică a timpului în care el a trăit. Lucrarea este întocmită de autori pe baza unei documentații care a cuprins : lucrările publicate de Otto Loewi, manuscrise nepublicate, publicații anonime în presă despre Otto Loewi, cuvîntări ale lui, scrisori, documente personale etc.

Născut în 1873 în Frankfurt pe Main, urmează gimnaziul în același oraș, fiind un elev eminent, cu înclinații atît către științele naturii cît și către științele umanistice și artă. În 1891

se înscrie la Facultatea de medicină din Strassburg. În 1895 își susține teza de doctor cu subiectul „Despre acțiunea cantitativă a acidului cianhidric, a arsenului și a fosforului asupra inimii de broască". În anii următori aprofundează cunoștințele de chimie anorganică, analitică și lucrează timp îndelungat în laboratorul de biochimie din Strassburg. Cu tema „Cercetări asupra metabolismului compușilor nucleici", este numit în anul 1900 doctor docent.

Cercetările i-au adus dovada că organismul animal, contrar părerilor de pe atunci, este capabil să-și sintetizeze singur proteinele din aminoacizi. În anul 1902—1903, Otto Loewi vizitează timp de o lună laboratorul Starling din Londra și rămîne surprins de faptul că rezultatele cercetărilor lui erau deja cunoscute. Lucrează apoi ca titular al catedrei de farmacologie de la Universitatea din Marburg. La Viena (1905) Otto Loewi își începe studiile asupra sistemului nervos. În 1909 este numit profesor de farmacologie la Universitatea din Graz; cu ocazia cercetărilor întreprinse aici, el descoperă creșterea sensibilității la adrenalină prin cocaină și dependența de acțiune dintre digitală și calciu, descoperiri care formează azi puncte de plecare ale unor cercetări aprofundate în domeniul respectiv. În 1921 demonstrează experimental unele ipoteze și păreri elaborate în Anglia, și anume dovedește „transmisia umorală a acțiunii nervilor cardiaci", „identifică compușii vagi și simpatici cu acetilcolina și adrenalina" și lămurește mecanismul de acțiune al atropinei și eserinei. În 1936, Comitetul de acordare a premiului Nobel propune și acordă acest premiu lui Otto Loewi și lui Henry Dale pentru cercetările lor în domeniul mecanismului de acțiune a nervilor periferici. În 1939 este nevoit să părăsească Austria și primește propunerea de numire ca profesor de farmacologie la Universitatea din New York; aici desfășoară o bogată activitate științifică și i se acordă doctoratul de onoare de către universitățile din New York, din Yale și din Graz.

În 1961, în urma unui atac cerebral, moare și este incinerat în localitatea Woods Hole, centru de cercetări marine, unde a activat și a însuflețit multe generații tinere.

A fost membru de onoare și a primit distincții de la 62 de instituții științifice. Sînt trecute în revistă 52 de aprecieri asupra personalității lui Otto Loewi, publicate în reviste și tratate. Lucrarea cuprinde de asemenea discursurile și cuvîntările în extenso ținute de profesorul Otto Loewi cu diferite ocazii. O listă completă a lucrărilor publicate, pe specialități și cronologic, completează această lucrare.

Viorica Frunzeti
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

Al 13-lea Simpozion al Societății germane de endocrinologie, Würzburg, 2—4 martie 1967, *Das testosteron. Die struma* (*Testosteronul. Gușa*), ed. ERICH KLEIN, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1968, 345 p., 106 fig.

Lucrările volumului de față sînt grupate în 3 secțiuni: I. Testosteronul și antiandrogenii (21); II. Gușa (12); III. Comunicări libere, axate pe probleme legate de: a) Tiroida și metabolismul iodului (4), b) Corticosuprarenala, hormonii steroizi, ACTH (13), c) Hipofiza și gonadele (3), d) Metode (2).

Testosteronul — biosinteza, metabolismul intracelular, distribuția, relațiile și metabolitii lui, fiziopatologia și aspectele clinice ale bilanțului testosteronului la bărbați și femei — a constituit subiectul a 5 referate prezentate în cadrul primei secțiuni a simpozionului. De asemenea au fost comunicate 4 lucrări originale privitoare la metabolismul testosteronului și epitestosteronului prin perfuzarea ficatului izolat de cîine, sinteza, distribuția și secreția

4-C^{14}-testosteronului după nefrectomia bilaterală, metaboliții inițiali ai testosteronului în hipotalamusul, adeno- și neurohipofiza șobolanilor masculi imaturi. Alte trei lucrări au ca subiect separarea și dozarea testosteronului și epitestosteronului în urina copiilor prepubertali, determinarea testosteronului și androstendionului, precum și a unui hormon stimulator al celulelor interstițiale în testiculul, respectiv hipofiza bovinelor, în perioada fetală și la naștere. Sînt comunicate unele rezultate obținute în folosirea hormonilor androgeni în terapia unor afecțiuni ginecologice, în farmacologia clinică a derivaților sintetici ai androstanului, precum și în experimentarea unui preparat androgenic — Mesterolonul.

Antiandrogenii constituie subiectul unui referat general și a 5 comunicări care tratează influența acestora asupra secreției de gonadotropină și a nivelului steroizilor în urina și plasma femeilor cu hirsutism sau aflate la menopauză, utilizarea antiandrogenului Cyproteronacetat în tratamentul sexualității patologic crescute la bărbați.

În a doua secțiune sînt prezentate 5 referate asupra diferitelor tipuri de guși: gușa datorată unor tulburări congenitale în utilizarea iodului, gușa netoxică, gușa limfomatoasă și bolile înrudite ale tiroidei, gușa iatrogenă, guși maligne. Se prezintă apoi rezultatele unor cercetări referitoare la folosirea unor metode citomorfologice și citochimice în diagnosticarea gușilor și a funcțiunii tiroidiene.

În partea I a secțiunii a III-a sînt comunicate cîteva lucrări în legătură cu metabolismul albuminei umane, marcate cu I^{131}, la bolnavii cu mixedem primar, studiul citologic al tiroidei de șobolan în hiper- și hipocalcemie și altele.

În partea a II-a sînt prezentate lucrări referitoare la biosinteza aldosteronului, a corticosteroizilor în cazul hipertrofiei compensatorii a suprarenalelor. Sînt prezentate cîteva cercetări în legătură cu influența gonadotropinelor și cortizolului asupra steroizilor, respectiv a metabolismului energetic din țesutul conjunctiv și muscular. Dintre metodele de cercetare prezentate în acest capitol, menționăm dozarea cetosteroizilor cu 2,4-dinitrofenilhidrazina, dozarea fluorometrică a 11-hidroxicorticosteroizilor în plasmă, în cazuri de hipertiroidism și insuficiență corticosuprarenală.

Într-o altă parte a secțiunii a III-a se prezintă 3 lucrări privitoare la funcția hipofizei și a gonadelor, iar în capitolul general de metodică remarcăm comunicarea unei metode rapide de dozare a insulinei în cantități mici de țesut (pînă la 10 mg).

Prin actualitatea teoretică și clinică a lucrărilor originale, ca și prin valoarea referatelor cuprinse în el, volumul de față este de un real ajutor cercetătorilor și medicilor interesați în probleme de endocrinologie.

Constanța Mușolan
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

U. F. GRUBER, *Blutersatz* (*Substituirea sîngelui*), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1968.

Această monografie se ocupă de problema practică extrem de importantă a substituenților de sînge pentru terapia stărilor de șoc, îndeosebi a șocului hemoragic. Materialul cuprins în 182 pagini de text este împărțit în 4 părți: 1) Fiziopatologia pierderilor de sînge și problema transportului oxigenului; 2) Diferitele modalități de substituție a masei sangvine: transfuzia de sînge, de plasmă, de soluții coloidale artificiale (dextran, gelatină, polivinilpirolidon) și de soluții de electroliți; 3) Discuții referitoare la terapia perorală, infuzia intraarterială,

hemoglobina şi transportul oxigenului, modele de şoc, metode de determinare a volumului sangvin, considerente de ordin practic etc. şi 4) Concluzii. Bibliografia cuprinde un număr neobişnuit de mare de referinţe (1584 titluri) şi este întregită de lista unor monografii şi referate generale asupra şocului şi a transfuziei de sînge şi de substituenţi.

Textul, întregit cu numeroase tabele şi figuri, reprezintă o punere la punct a celor mai recente achiziţii, atît clinice cît şi experimentale. El cuprinde o prezentare amănunţită şi critică a diferitelor modalităţi de substituţie a masei sangvine, iar valoarea sa documentară este considerabilă, datorită numărului mare de autori citaţi şi de lucrări analizate.

Lucrarea este de un interes deosebit pentru activitatea personalului din reţeaua de transfuzii şi pentru anestezişti-reanimatori.

P. Teitel
Centrul de hematologie, Bucureşti

INTERNATIONAL SERIES OF MONOGRAPHS IN PURE AND APPLIED BIOLOGY (BIOCHEMISTRY DIVISION). Vol. 5 : *The Biochemistry of Foreign Compounds* (*Biochimia compuşilor străini*), ed. Dennis V. Parke, Pergamon Press, 1968, 269 p.

O caracteristică importantă a vieţii contemporane o constituie folosirea extensivă a unor produşi chimici ca pesticide, ingrediente alimentare şi cosmetice, droguri şi altele. Studiul biochimiei acestor produşi, cunoscuţi sub denumirea de compuşi străini, are aplicaţii importante în farmacologie şi toxicologie, cu vădite implicaţii economice şi sociologice.

Volumul de faţă se ocupă tocmai de aceste substanţe, fiind divizat în două părţi : prima parte, „Mecanisme biochimice", cu 7 capitole, se referă la absorbţia şi excreţia compuşilor străini, cea de a doua, „Aplicaţii", cu 4 capitole, cuprinde descrierea şi exemple ilustrative pentru clasele majore ale acestor compuşi. Întrucît publicaţiile privind compuşii străini sînt foarte numeroase, a fost necesară o selecţie plină de discernămînt a lucrărilor, numărul celor consultate ridicîndu-se la 351.

Capitolul I se ocupă de soarta compuşilor străini ingeraţi cu hrana, cu aerul inspirat sau prin piele şi metabolizaţi în două faze de reacţie : prin transformare metabolică şi prin conjugare. Prin detoxicare, efectuată în principal de ficat, animalele se apără chimic de aceste substanţe ce pot deveni toxice. Absorbţia, excreţia şi distribuţia compuşilor străini în ţesut este subiectul celui de al II-lea capitol, alături de procese care implică transferul acestor molecule prin diferite membrane ale organismului (epiteliul gastrointestinal, al tubului renal, pielea). Transferul substanţelor se produce prin 4 mecanisme : simpla difuzie prin membrană, filtrarea, pinocitoza şi transferul activ. Tot aici autorul tratează factorii care afectează absorbţia şi excreţia lor la diferite etaje, sensibilitatea imunologică la compuşii străini. În capitolul III, bogat ilustrat, sînt descrise transformările metabolice catalizate de enzimele hepatice microzomale, acordîndu-se spaţii largi mecanismelor hidroxilării microzomale a compuşilor aciclici, aliciclici şi aromatici, dezaminării, desulfurării, reducerii compuşilor nitro şi azo. Capitolul următor, al IV-lea, abordează alte transformări metabolice catalizate prin sisteme enzimatice nemicrozomale : aminooxidaze, xantinoxidaze, alcooldehidrogenaze, esteraze şi enzimele florei intestinale. Conjugările sînt biosinteze în care compuşii străini sau metaboliţii lor se combină cu anumite substrate pentru a forma conjugaţi, ele fiind subiectul capitolului al V-lea. Metabolismul compuşilor străini (redat în capitolul VI), este influenţat de o serie de factori fiziologici (vîrsta, diferenţieri legate de sex, hormoni, nutriţie), de mediu (radiaţii ionizante) şi genetici.

Capitolul VII se ocupă de metabolismul comparativ al acestor compuşi la diferite specii, arătînd cauzele diferenţelor specifice în toxicitatea şi activitatea lor farmacologică.

A doua parte a lucrării, „Aplicaţii", cuprinde în al VIII-lea capitol descrierea compuşilor străini de origine vegetală, a acizilor, aminelor, fenolilor, terpenelor, cumarinelor etc. Capitolul IX studiază ingredientele (coloranţi, emulsifianţi, antioxidanţi, dulciuri, contaminanţi ai hranei). Un alt capitol, al X-lea, se ocupă de droguri : carbamaţi, sulfonamide, barbiturice şi altele. Capitolul al XI-lea este dedicat pesticidelor (insecticide, ierbicide, fungicide etc.) care numără astăzi peste 700 de diferiţi compuşi chimici ce protejează omul, animalele şi recoltele de nenumărate boli. Ultimul capitol al cărţii, al XII-lea, abordează produşii chimici industriali necesari pentru obţinerea unor detergenţi, coloranţi etc.

Cartea se încheie cu un index al autorilor şi subiectelor, venind astfel şi mai mult în sprijinul cititorului ; este apărută în admirabile condiţii grafice, distingîndu-se prin claritate, printr-o bogăţie de ilustraţii şi scheme ajutătoare şi este de un real folos atît studenţilor, cît şi lucrătorilor din domeniile în care aceşti compuşi străini îşi găsesc o întrebuinţare din ce în ce mai largă.

Ioana Călin
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

EUGENE P. WIGNER, *Symmetries and Reflections. Scientific Essays*, Indiana University Press, Bloomington & London, 1967.

Lucrarea, scrisă de unul dintre cei mai mari fizicieni contemporani, cuprinde o mare varietate de subiecte, de la rolul principiilor invarianţei în filozofia naturală, dovezile existenţei sistemelor biologice, problemele epistemologice ale mecanicii cuantice, pînă la reflecţii personale despre limitele în ştiinţă, dezvoltarea lor, perspective şi pericole.

În prima parte a lucrării, autorul, bun cunoscător al problemelor de simetrie, explorează relaţiile dintre invarianţă şi principiile conservării, rolul invarianţei în teoria cuantică şi, printr-o discuţie subtilă, ajunge la problema invarianţei faţă de deplasările în spaţiu şi timp şi, în final, la problema fundamentală şi dificilă a invarianţei relativiste şi fenomenele cuantice.

Unele dintre problemele ridicate de Wigner, în maniera sa personală, par neobişnuit de stimulante. O deosebită importanţă din punct de vedere biologic prezintă problemele legate de legile biotonice, cu toate că, uneori, aceste probleme duc la rezultate descurajatoare. O lege biotonică este considerată o lege a naturii ce nu poate fi integrată în legile fizicii. În acest context, Wigner analizează probleme de tipul : „exclude mecanica cuantică viaţa?" şi prezintă un argument teoretic elegant, care duce practic la probabilitatea zero pentru existenţa stărilor autoreproductibile.

Problemele filozofice legate de conştiinţă ca subiect de cercetare ştiinţifică sînt reflecţii ale contribuţiilor majore ale lui Wigner în variate domenii de interes fizic, de la principiile invarianţei, teoria nucleară, la teoria solidului.

Aspectele filozofice prezentate pot provoca unele confuzii, în special privind existenţa a două feluri de realităţi : „conştiinţă şi orice altceva". Totuşi, trebuie recunoscută dorinţa sinceră a lui Wigner de a extinde scopul cercetării ştiinţifice şi în aceste domenii.

Problemele epistemologice ale mecanicii cuantice prezintă un interes particular, în special în ceea ce priveşte teoria măsurii. În analiza deficienţei conceptuale principiale a punctului

de vedere ortodox, două aspecte sînt relevate. Întîi, ni se arată că dubiile privind validitatea principiului de superpoziţie pentru procesul de măsură sînt legate direct de natura „macroscopică" a aparatului. Aşa cum remarcă Wigner, pentru unele observabile (ca xyp_2) nimeni nu crede în mod serios că există un aparat de măsură. În al doilea rînd, apare o dificultate, deşi probabil mai puţin serioasă, în legătură cu probabilitatea interacţiunii dintre obiect şi aparat. Printr-un argument elegant, similar aceluia care duce la probabilitatea zero pentru sistemele reproductibile, „mărimea largă" a aparatului este din nou regăsită ca „esenţială" pentru posibilitatea măsurătorii. În cele din urmă, trebuie să remarcăm că Wigner nu exclude de loc posibilitatea interferenţei conştiinţei cu fenomenele fizice.

Unele capitole importante din această parte a lucrării (problema măsurii şi remarcile asupra problemei materie-conştiinţă) prezintă un caracter destul de tehnic şi necesită o oarecare familiaritate cu teoriile matriceale.

Alte contribuţii se referă la nucleu, la acţiunea radiaţiilor asupra corpurilor solide, ca şi la un punct de vedere personal privind efectele viitoare ale energiei nucleare pentru societate.

S. Comoroşan
Spitalul clinic-Fundeni

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : Viaţa ştiinţifică, în care prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. Recenzii — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţială. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 2, Sectorul I.

1969 JAN 10

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA
ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii ribonucleici celulari şi virali**, 1966, 25 × 17,50, 375 p., 8 pl., legat, anvelopă, 26 lei.

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţa şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie**, 1966, 25 x 17,50, 285 p., 18 pl., legat, anvelopă. 27 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese. Œuvres choisies**, 1965, 25 × 17,50, 687 p., legat, anvelopă, 44 lei.

* * * **Omagiu acad. prof. RALUCA RIPAN**, 1966, 30,50 × 21,50, 628 p. + 2 pl., legat, anvelopă, 50 lei.

La revue „Studii şi cercetări de biochimie" paraît 4 fois par an. Le prix d'un abonnement annuel est de $ 5.—FF. 25—DM. 20.—Toute commande à l'étranger sera adressée à CARTIMEX, Boîte postale 134—135 Bucarest, Roumanie ou à ses représentants à l'étranger. En Roumanie, vous pourrez vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 11, NR. 4, P. 327 – 438,
BUCUREŞTI, DECEMBRIE 1968

I P. Informaţia – c. 5872 | 43316 | Lei 12.—